

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **042024**

(13) **B1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента
2022.12.28

(21) Номер заявки
201792413

(22) Дата подачи заявки
2016.05.04

(51) Int. Cl. **C07K 16/28** (2006.01)
C07K 16/30 (2006.01)
C07K 7/08 (2006.01)
A61K 47/48 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(54) **АНТИТЕЛА ПРОТИВ CD71, АКТИВИРУЕМЫЕ АНТИТЕЛА ПРОТИВ CD71 И СПОСОБЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ**

(31) **62/156,838; 62/257,321; 62/257,484;**

62/277,775; 62/310,553; 62/315,276

(32) **2015.05.04; 2015.11.19; 2015.11.19;**

2016.01.12; 2016.03.18; 2016.03.30

(33) **US**

(43) **2018.06.29**

(86) **PCT/US2016/030738**

(87) **WO 2016/179257 2016.11.10**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:

**САЙТОМКС ТЕРАПЬЮТИКС, ИНК.
(US)**

(72) Изобретатель:

**Сэйджерт Джейсон Гэри, Типтон
Кимберли Энн, Терретт Джонатан
Александр, Сингх Швета, Уивер Энни
Янг, Денуаер Люк Ролан (US)**

(74) Представитель:

Медведев В.Н. (RU)

(56) **WO-A2-2014189973**

**FRIDEN P. M. ET AL.:
"CHARACTERIZATION, RECEPTOR MAPPING
AND BLOOD-BRAIN BARRIER TRANSCYTOSIS
OF ANTIBODIES TO THE HUMAN
TRANSFERRIN RECEPTOR", JOURNAL OF
PHARMACOLOGY AND EXPERIMENTAL
THERAPEUTICS, AMERICAN SOCIETY FOR
PHARMACOLOGY AND EXPERIMENTAL
THERAPEUTICS, US, vol. 278, no. 3, 1 September
1996 (1996-09-01), pages 1491-1498, XP000984836,
ISSN: 0022-3565, whole document, especially the
Abstract**

US-A1-2013177579

US-A1-2013045206

(57) Изобретение относится, главным образом, к антителам, связывающим CD71, активируемым антителам, специфически связывающим CD71, и к способам получения и применения этих антител против CD71 и активируемых антител против CD71 при множестве терапевтических, диагностических и профилактических показаний.

B1

042024

042024

B1

Родственные заявки

По этой заявке испрашивается приоритет.

Предварительных заявок США № 62/156838, поданной 4 мая 2015 г.; 62/257321, поданной 19 ноября 2015 г.; 62/257484, поданной 19 ноября 2015 г.; 62/277775, поданной 12 января 2016 г.; 62/310553, поданной 18 марта 2016 г.; и 62/315276, поданной 30 марта 2016 г., полное содержание каждой из которых приведено в настоящем документе в качестве ссылки.

Область техники, к которой относится изобретение

Изобретение относится, главным образом, к антителам, связывающим CD71, активируемым антителам, специфически связывающим CD71, и к способам получения и применения этих антител против CD71 и активируемых антител против CD71 при множестве терапевтических, диагностических и профилактических показаний.

Уровень техники для изобретения

Доказано, что способы терапии на основе антител являются эффективными для лечения нескольких заболеваний, но в некоторых случаях, токсичность из-за широкой экспрессии мишени ограничивает их терапевтическую эффективность. Кроме того, лекарственные средства на основе антител обладают другими ограничениями, такими как быстрое выведение из кровотока после введения.

В сфере низкомолекулярных лекарственных средств разработаны способы предоставления пролекарств активного химического соединения. Такие пролекарства вводят в относительно неактивной (или значительно менее активной) форме. После введения пролекарство подвергается метаболизму *in vivo* до активного соединения. Такие способы с использованием пролекарства могут обеспечивать увеличенную избирательность лекарственного средства для намеченной для него мишени и для уменьшения неблагоприятных эффектов.

Соответственно в области лекарственных средств на основе антител существует постоянная необходимость в антителах, имитирующих желательные характеристики низкомолекулярного пролекарства.

Сущность изобретения

Описание относится к антителам или их антигенсвязывающим фрагментам, специфически связывающим CD71, известный также как белок рецептор трансферрина 1 (TfR1).

В некоторых вариантах осуществления антитело включает в себя антитело или его антигенсвязывающий фрагмент специфически связывающий CD71. В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, связывающий CD71, представляет собой моноклональное антитело, доменное антитело, отдельную цепь, фрагмент Fab, фрагмент F(ab')₂, scFv, scAb, dAb, антитело из одиночного домена тяжелой цепи или антитело из одиночного домена легкой цепи. В некоторых вариантах осуществления, такое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, связывающие CD71, представляют собой антитело мыши, другого грызуна, химерное, гуманизованное или полностью человеческое моноклональное антитело.

В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит аминокислотную последовательность вариабельной области тяжелой цепи, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1, и 3-5. В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит аминокислотную последовательность вариабельной области тяжелой цепи, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 3-5.

В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит аминокислотную последовательность вариабельной области легкой цепи, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2 и 6-8. В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит аминокислотную последовательность вариабельной области легкой цепи, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 6-8.

В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит аминокислотную последовательность вариабельной области тяжелой цепи, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1 и 3-5, и аминокислотную последовательность вариабельной области легкой цепи или ее антигенсвязывающего фрагмента, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2 и 6-8.

В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит аминокислотную последовательность вариабельной области тяжелой цепи, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 3-5, и аминокислотную последовательность вариабельной области легкой цепи, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 6-8.

В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит аминокислотную последовательность вариабельной области тяжелой цепи, по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичную аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1 и 3-5. В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит аминокислотную последовательность вариабельной области тяжелой цепи, по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичную аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 3-5.

В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит аминокислотную последовательность вариабельной области легкой цепи, по меньшей мере на 90%, 91%,

занной в табл. 13.

В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно плечо мультиспецифического антигена или его антигенсвязывающего фрагмента, например биспецифического антигена или его антигенсвязывающего фрагмента, содержит комбинацию последовательности CDR1 VH, последовательности CDR2 VH, последовательности CDR3 VH, последовательности CDR1 VL, последовательности CDR2 VL и последовательности CDR3 VL, где комбинация представляет собой комбинацию из шести последовательностей CDR (CDR1 VH, CDR2 VH, CDR3 VH, CDR1 VL, CDR2 VL и CDR3 VL), показанных в одной строке в табл. 13.

В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно плечо мультиспецифического антигена или его антигенсвязывающего фрагмента, например биспецифического антигена или его антигенсвязывающего фрагмента, содержит вариабельную область легкой цепи, содержащую комбинацию последовательности CDR1 VL, последовательности CDR2 VL и последовательности CDR3 VL, где комбинация представляет собой комбинацию из трех последовательностей CDR легкой цепи (CDR1 VL, CDR2 VL, CDR3 VL), показанных в одной строке в табл. 13.

В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно плечо мультиспецифического антигена или его антигенсвязывающего фрагмента, например биспецифического антигена или его антигенсвязывающего фрагмента, содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую комбинацию последовательности CDR1 VH, последовательности CDR2 VH и последовательности CDR3 VH, где комбинация представляет собой комбинацию из трех последовательностей CDR тяжелой цепи (CDR1 VH, CDR2 VH, CDR3 VH), показанных в одной строке в табл. 13.

В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно плечо мультиспецифического антигена или его антигенсвязывающего фрагмента, например биспецифического антигена или его антигенсвязывающего фрагмента, содержит комбинацию последовательности CDR1 VH, последовательности CDR2 VH, последовательности CDR3 VH, последовательности CDR1 VL, последовательности CDR2 VL и последовательности CDR3 VL, где каждая последовательность CDR в комбинации содержит последовательность, по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичную соответствующей последовательности CDR в комбинации из шести последовательностей CDR (CDR1 VH, CDR2 VH, CDR3 VH, CDR1 VL, CDR2 VL и CDR3 VL), показанных в одной строке в табл. 13.

В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно плечо мультиспецифического антигена или его антигенсвязывающего фрагмента, например, биспецифического антигена или его антигенсвязывающего фрагмента, содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую комбинацию последовательности CDR1 VH, последовательности CDR2 VH и последовательности CDR3 VH, где каждая последовательность CDR в комбинации содержит последовательность, по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичную соответствующей последовательности CDR в комбинации из трех последовательностей CDR тяжелой цепи (CDR1 VH, CDR2 VH, CDR3 VH), показанных в одной строке в табл. 13.

В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно плечо мультиспецифического антигена или его антигенсвязывающего фрагмента, например биспецифического антигена или его антигенсвязывающего фрагмента, содержит вариабельную область легкой цепи, содержащую комбинацию последовательности CDR1 VL, последовательности CDR2 VL и последовательности CDR3 VL, где каждая последовательность CDR в комбинации содержит последовательность, по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичную соответствующей последовательности CDR в комбинации из трех последовательностей CDR легкой цепи (CDR1 VL, CDR2 VL, CDR3 VL), показанных в одной строке в табл. 13.

Пригодные антитела против CD71 по этому описанию включают в себя также антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, связывающие тот же самый эпитоп на CD71 человека и/или CD71 яванского макака, что и антитело против CD71, содержащее аминокислотную последовательность вариабельной области тяжелой цепи, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1 и 3-5, и аминокислотную последовательность вариабельной области легкой цепи, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2 и 6-8.

Пригодные антитела против CD71 по этому описанию включают в себя также антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, связывающие тот же самый эпитоп на CD71 человека и/или CD71 яванского макака, что и антитело против CD71, содержащее последовательность CDR1 VH, содержащую аминокислотную последовательность GYTFTSYWMH (SEQ ID NO: 9); последовательность CDR2 VH, содержащую аминокислотную последовательность AIYPGNSETG (SEQ ID NO: 10); последовательность CDR3 VH, содержащую аминокислотную последовательность ENWDPGFAP (SEQ ID NO: 11); последовательность CDR1 VL, содержащую аминокислотную последовательность SASSSVYYMY (SEQ ID NO: 12) или CRASSSVYYMY (SEQ ID NO: 13); последовательность CDR2 VL, содержащую аминокислотную последовательность STSNLAS (SEQ ID NO: 14); и последовательность CDR3 VL, содержащую аминокислотную последовательность QQRNYPYT (SEQ ID NO: 15).

Пригодные антитела против CD71 по этому описанию включают в себя также антитело или его ан-

тигенсвязывающий фрагмент, перекрестно конкурирующие за связывание с CD71 человека и/или CD71 яванского макака с антителом против CD71, содержащим аминокислотную последовательность вариабельной области тяжелой цепи, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1 и 3-5, и аминокислотную последовательность вариабельной области легкой цепи, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2 и 6-8.

Пригодные антитела против CD71 по этому описанию включают в себя также антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, перекрестно конкурирующие за связывание с CD71 человека и/или CD71 яванского макака с антителом против CD71, содержащим последовательность CDR1 VH, содержащую аминокислотную последовательность GYTFTSYWMH (SEQ ID NO: 9); последовательность CDR2 VH, содержащую аминокислотную последовательность AIYPGNSETG (SEQ ID NO: 10); последовательность CDR3 VH, содержащую аминокислотную последовательность ENWDPGFAF (SEQ ID NO: 11); последовательность CDR1 VL, содержащую аминокислотную последовательность SASSSVYYMY (SEQ ID NO: 12) или CRASSSVYYMY (SEQ ID NO: 13); последовательность CDR2 VL, содержащую аминокислотную последовательность STSNLAS (SEQ ID NO: 14); и последовательность CDR3 VL, содержащую аминокислотную последовательность QQRNYPYT (SEQ ID NO: 15).

В некоторых вариантах осуществления антитело против CD71 по этому описанию содержит выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент (AB) специфически связывающие CD71 млекопитающих, где AB специфически связывает CD71 человека и CD71 яванского макака. В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит последовательность CDR1 VH GYTFTSYWMH (SEQ ID NO: 9); последовательность CDR2 VH AIYPGNSETG (SEQ ID NO: 10); последовательность CDR3 VH ENWDPGFAF (SEQ ID NO: 11); последовательность CDR1 VL SASSSVYYMY (SEQ ID NO: 12) или CRASSSVYYMY (SEQ ID NO: 13); последовательность CDR2 VL STSNLAS (SEQ ID NO: 14); и последовательность CDR3 VL QQRNYPYT (SEQ ID NO: 15). В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 3-5, и вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 6-8.

В некоторых вариантах осуществления выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связывается с тем же самым эпитопом на CD71 человека и/или CD71 яванского макака, что и выделенное антитело, содержащее последовательность CDR1 VH GYTFTSYWMH (SEQ ID NO: 9); последовательность CDR2 VH AIYPGNSETG (SEQ ID NO: 10); последовательность CDR3 VH ENWDPGFAF (SEQ ID NO: 11); последовательность CDR1 VL SASSSVYYMY (SEQ ID NO: 12) или CRASSSVYYMY (SEQ ID NO: 13); последовательность CDR2 VL STSNLAS (SEQ ID NO: 14); и последовательность CDR3 VL QQRNYPYT (SEQ ID NO: 15). В некоторых вариантах осуществления выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связывается с тем же самым эпитопом на CD71 человека и/или CD71 яванского макака, что и выделенное антитело, содержащее вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 3-5, и вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 6-8. В некоторых вариантах осуществления его антигенсвязывающий фрагмент выбран из группы, состоящей из фрагмента Fab, фрагмента F(ab')₂, scFv, scAb, dAb, антитела из одиночного домена тяжелой цепи и антитела из одиночного домена легкой цепи. В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент специфически связывает CD71 человека.

В некоторых вариантах осуществления выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент проявляет перекрестную конкуренцию с выделенным антителом, содержащим последовательность CDR1 VH GYTFTSYWMH (SEQ ID NO: 9); последовательность CDR2 VH AIYPGNSETG (SEQ ID NO: 10); последовательность CDR3 VH ENWDPGFAF (SEQ ID NO: 11); последовательность CDR1 VL SASSSVYYMY (SEQ ID NO: 12) или CRASSSVYYMY (SEQ ID NO: 13); последовательность CDR2 VL STSNLAS (SEQ ID NO: 14); и последовательность CDR3 VL QQRNYPYT (SEQ ID NO: 15). В некоторых вариантах осуществления выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент проявляет перекрестную конкуренцию с выделенным антителом, содержащим вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 3-5, и вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 6-8.

В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент является конъюгированным со средством. В некоторых вариантах осуществления выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент проявляет перекрестную конкуренцию с выделенным антителом, содержащим последовательность CDR1 VH GYTFTSYWMH (SEQ ID NO: 9); последовательность CDR2 VH AIYPGNSETG (SEQ ID NO: 10); последовательность CDR3 VH ENWDPGFAF (SEQ ID NO: 11); последовательность CDR1 VL SASSSVYYMY (SEQ ID NO: 12) или CRASSSVYYMY (SEQ ID NO: 13); последовательность CDR2 VL STSNLAS (SEQ ID NO: 14); и последовательность CDR3 VL QQRNYPYT (SEQ ID NO: 15). В некоторых вариантах осуществления выделенное антитело или его антигенсвязывающий

фрагмент проявляет перекрестную конкуренцию с выделенным антителом, содержащим вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 3-5, и вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 6-8. В некоторых вариантах осуществления средство представляет собой токсин или его фрагмент. В некоторых вариантах осуществления средство представляет собой ингибитор микротрубочек. В некоторых вариантах осуществления средство представляет собой средство, повреждающее нуклеиновую кислоту. В некоторых вариантах осуществления средство выбрано из группы, состоящей из доластатина или его производного, ауристатина или его производного, майтанзиноида или его производного, дуокармицина или его производного, калихеамицина или его производного и пирролобензодиазепина или его производного. В некоторых вариантах осуществления средство представляет собой ауристатин E или его производное. В некоторых вариантах осуществления средство представляет собой монометилауристатин E (ММАЕ). В некоторых вариантах осуществления средство представляет собой монометилауристатин D (ММАД). В некоторых вариантах осуществления средство представляет собой майтанзиноид, выбранный из группы, состоящей из DM1 и DM4. В некоторых вариантах осуществления средство представляет собой майтанзиноид DM4. В некоторых вариантах осуществления средство представляет собой дуокармицин. В некоторых вариантах осуществления средство является конъюгированным с АВ посредством линкера. В некоторых вариантах осуществления линкер, с помощью которого средство конъюгируют с АВ, содержит группу SPDB, группу vc или группу PEG2-VC. В некоторых вариантах осуществления линкер и токсин, конъюгированные с АВ, содержат группу SPDB-DM4, группу vc-ММАД, группу vc-ММАЕ, vc-дуокармицин, или группу PEG2-VC-ММАД. В некоторых вариантах осуществления линкер представляет собой расщепляемый линкер. В некоторых вариантах осуществления, линкер представляет собой нерасщепляемый линкер. В некоторых вариантах осуществления средство представляет собой поддающуюся детекции группу. В некоторых вариантах осуществления поддающаяся детекции группа представляет собой диагностическое средство.

В некоторых вариантах осуществления конъюгированное антитело включает в себя конъюгированное антитело, содержащее: (а) антитело или его антигенсвязывающий фрагмент (АВ), специфически связывающиеся с CD71 млекопитающих, где АВ содержит: (i) последовательность CDR1 VH GYTFSTSYWMH (SEQ ID NO: 9); последовательность CDR2 VH AIYPGNSETG (SEQ ID NO: 10); последовательность CDR3 VH ENWDPGFAF (SEQ ID NO: 11); последовательность CDR1 VL SASSSVYYMY (SEQ ID NO: 12) или CRASSSVYYMY (SEQ ID NO: 13); последовательность CDR2 VL STSNLAS (SEQ ID NO: 14); и последовательность CDR3 VL QQRRNYPYT (SEQ ID NO: 15) или (ii) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 3-5, и вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 6-8; (b) средство, конъюгированное с АВ, где средство выбрано из группы, состоящей из ауристатина E, монометилауристатина F (ММАF), монометилауристатина E (ММАЕ), монометилауристатина D (ММАД), майтанзиноида DM4, майтанзиноида DM1, пирролобензодиазепина, димера пирролобензодиазепина и дуокармицина.

Описание относится также к активируемым антителам, включающим в себя антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, специфически связывающие CD71, присоединенные к маскирующей группе (ММ), такой, что присоединение ММ уменьшает способность антитела или его антигенсвязывающего фрагмента связывать CD71. В некоторых вариантах осуществления ММ присоединяют посредством последовательности, содержащей субстрат для протеазы, например, протеазы, которая является активной в пораженной заболеванием ткани, и/или протеазы, локализованной совместно с CD71 в участке лечения у субъекта. Активируемые антитела против CD71, представленные в настоящем документе, также обозначенные в настоящем документе взаимозаменяемо как активируемые антитела против CD71 или активируемые антитела к CD71, являются стабильными в кровотоке, активируемыми в намеченных для терапии и/или диагностики участках, но не в нормальной, например, здоровой, ткани или другой ткани, не намеченной для лечения и/или диагностики, и, при активации, обладают связыванием с CD71, по меньшей мере, сравнимым с соответствующим немодифицированным антителом, также обозначаемым в настоящем документе как исходное антитело.

Изобретение относится также к способам лечения, предотвращения и/или задержки начала или прогрессирования, или облегчения симптома, ассоциированного с измененной экспрессией и/или активностью CD71, у субъекта с использованием активируемых антител, связывающих CD71, в частности, активируемых антител, связывающих и нейтрализующих или иным способом ингибирующих по меньшей мере один вид биологической активности CD71 и/или опосредованной CD71 передачи сигналов.

Изобретение относится также к способам лечения, предотвращения и/или задержки начала или прогрессирования, или облегчения симптома, ассоциированного с присутствием, ростом, пролиферацией, метастазированием и/или активностью клеток с экспрессией CD71 или измененной экспрессией CD71 у субъекта, с использованием активируемых антител, связывающих CD71, в частности, активируемых антител, связывающих, нацеливающих, нейтрализующих, уничтожающих или иным способом ингибирующих по меньшей мере один вид биологической активности клеток с экспрессией или измененной

экспрессией CD71.

Изобретение относится также к способам лечения, предотвращения и/или задержки начала или прогрессирования, или облегчения симптома, ассоциированного с присутствием, ростом, пролиферацией, метастазированием и/или активностью клеток, экспрессирующих CD71, у субъекта с использованием активируемых антител, связывающих CD71, в частности, активируемых антител, связывающих, нацеливающих, нейтрализующих, уничтожающих или иным способом ингибирующих по меньшей мере один вид биологической активности клеток, экспрессирующих CD71.

Изобретение относится также к способам лечения, предотвращения и/или задержки начала или прогрессирования, или облегчения симптома, ассоциированного с присутствием, ростом, пролиферацией, метастазированием и/или активностью клеток с измененной экспрессией CD71 у субъекта с использованием активируемых антител, связывающих CD71, в частности активируемых антител, связывающих, нацеливающих, нейтрализующих, уничтожающих или иным способом ингибирующих по меньшей мере один вид биологической активности клеток с измененной экспрессией CD71.

Активируемые антитела в активированном состоянии связывают CD71 и включают в себя (i) анти-тело или его антигенсвязывающий фрагмент (AB), специфически связывающие CD71; (ii) маскирующую группу (MM), которая, когда активируемое антитело находится в нерасщепленном состоянии, ингибирует связывание AB с CD71; и (с) расщепляемую группу (CM), присоединенную к AB, где CM представляет собой полипептид, функционирующий в качестве субстрата для протеазы.

В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело в нерасщепленном состоянии обладает следующей структурной аранжировкой от N-конца к С-концу: MM-CM-AB или AB-CM-MM.

В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело содержит связывающий пептид между MM и CM.

В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело содержит связывающий пептид между CM и AB.

В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело содержит первый связывающий пептид (LP1) и второй связывающий пептид (LP2), и где активируемое антитело в нерасщепленном состоянии обладает следующей структурной аранжировкой от N-конца к С-концу: MM-LP1-CM-LP2-AB или AB-LP2-CM-LP1-MM. В некоторых вариантах осуществления два связывающих пептида не обязательно должны быть идентичны друг другу.

В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один из LP1 или LP2 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из (GS)_n, (GGS)_n, (GSGGS)_n (SEQ ID NO: 339) и (GGGS)_n (SEQ ID NO: 340), где n представляет собой целое число по меньшей мере один.

В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере один из LP1 или LP2 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из GGS (SEQ ID NO: 341), GGSGG (SEQ ID NO: 342), GSGSG (SEQ ID NO: 343), GSGGG (SEQ ID NO: 344), GGS (SEQ ID NO: 345) и GSSSG (SEQ ID NO: 346).

В некоторых вариантах осуществления LP1 содержит аминокислотную последовательность GSSGGSGGSGG (SEQ ID NO: 347), GSSGGSGGSGG (SEQ ID NO: 348), GSSGGSGGSGGS (SEQ ID NO: 349), GSSGGSGGSGGSGGS (SEQ ID NO: 350), GSSGGSGGSGG (SEQ ID NO: 351) или GSSGGSGGSGS (SEQ ID NO: 352).

В некоторых вариантах осуществления LP2 содержит аминокислотную последовательность GSS, GGS, GGGS (SEQ ID NO: 353), GSSGT (SEQ ID NO: 354) или GSSG (SEQ ID NO: 355).

В некоторых вариантах осуществления AB обладает константой диссоциации приблизительно 100 нМ или менее для связывания с CD71 млекопитающих. В некоторых вариантах осуществления AB обладает константой диссоциации приблизительно 10 нМ или менее для связывания с CD71 млекопитающих. В некоторых вариантах осуществления AB обладает константой диссоциации приблизительно 5 нМ или менее для связывания с CD71. В некоторых вариантах осуществления AB обладает константой диссоциации приблизительно 1 нМ или менее для связывания с CD71. В некоторых вариантах осуществления AB обладает константой диссоциации приблизительно 0,5 нМ или менее для связывания с CD71. В некоторых вариантах осуществления AB обладает константой диссоциации приблизительно 0,1 нМ или менее для связывания с CD71. В некоторых вариантах осуществления, AB обладает константой диссоциации 0,01 нМ - 100 нМ, 0,01 нМ - 10 нМ, 0,01 нМ - 5 нМ, 0,01 нМ - 1 нМ, 0,01 нМ - 0,5 нМ, 0,01 нМ - 0,1 нМ, 0,01 нМ - 0,05 нМ, 0,05 нМ - 100 нМ, 0,05 нМ - 10 нМ, 0,05 нМ - 5 нМ, 0,05 нМ - 1 нМ, 0,05-0,5 нМ, 0,05 нМ - 0,1 нМ, 0,1 нМ - 100 нМ, 0,1 нМ - 10 нМ, 0,1 нМ - 5 нМ, 0,1 нМ - 1 нМ, 0,1-0,5 нМ, 0,5 нМ - 100 нМ, 0,5 нМ - 10 нМ, 0,5 нМ - 5 нМ, 0,5 нМ - 1 нМ, 1 нМ -100 нМ, 1 нМ - 10 нМ, 1 нМ - 5 нМ, 5 нМ - 100 нМ, 5 нМ - 10 нМ или 10 нМ - 100 нМ, для связывания с CD71 млекопитающих.

В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело включает в себя антитело или его антигенсвязывающий фрагмент (AB), специфически связывающие CD71. В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, связывающие CD71, представляют собой моноклональное антитело, доменное антитело, отдельную цепь, фрагмент Fab, фрагмент F(ab')₂, scFv, scAb, dAb, антитело из одиночного домена тяжелой цепи или антитело из одиночного домена легкой цепи. В некоторых вариантах осуществления такое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, свя-

зываются CD71, представляют собой антитело мыши, другого грызуна, химерное, гуманизированное или полностью человеческое моноклональное антитело.

В некоторых вариантах осуществления, активируемое антитело в нерасщепленном состоянии специфически связывает CD71 млекопитающих с константой диссоциации, меньшей или равной 1 нМ, меньшей или равной 5 нМ, меньшей или равной 10 нМ, меньшей или равной 15 нМ, меньшей или равной 20 нМ, меньшей или равной 25 нМ, меньшей или равной 50 нМ, меньшей или равной 100 нМ, меньшей или равной 150 нМ, меньшей или равной 250 нМ, меньшей или равной 500 нМ, меньшей или равной 750 нМ, меньшей или равной 1000 нМ и/или меньшей или равной 2000 нМ.

В некоторых вариантах осуществления, активируемое антитело в нерасщепленном состоянии специфически связывает CD71 млекопитающих с константой диссоциации в диапазоне 1 нМ - 2000 нМ, 1 нМ - 1000 нМ, 1 нМ - 750 нМ, 1 нМ - 500 нМ, 1 нМ - 250 нМ, 1 нМ - 150 нМ, 1 нМ - 100 нМ, 1 нМ - 50 нМ, 1 нМ - 25 нМ, 1 нМ - 15 нМ, 1 нМ - 10 нМ, 1 нМ - 5 нМ, 5 нМ - 2 000 нМ, 5 нМ - 1000 нМ, 5 нМ - 750 нМ, 5 нМ - 500 нМ, 5 нМ - 250 нМ, 5 нМ - 150 нМ, 5 нМ - 100 нМ, 5 нМ - 50 нМ, 5 нМ - 25 нМ, 5 нМ - 15 нМ, 5 нМ - 10 нМ, 10 нМ - 2000 нМ, 10 нМ - 1000 нМ, 10 нМ - 750 нМ, 10 нМ - 500 нМ, 10 нМ - 250 нМ, 10 нМ - 150 нМ, 10 нМ - 100 нМ, 10 нМ - 50 нМ, 10 нМ - 25 нМ, 10 нМ - 15 нМ, 15 нМ - 2000 нМ, 15 нМ - 1000 нМ, 15 нМ - 750 нМ, 15 нМ - 500 нМ, 15 нМ - 250 нМ, 15 нМ - 150 нМ, 15 нМ - 100 нМ, 15 нМ - 50 нМ, 15 нМ - 25 нМ, 25 нМ - 2000 нМ, 25 нМ - 1000 нМ, 25 нМ - 750 нМ, 25 нМ - 500 нМ, 25 нМ - 250 нМ, 25 нМ - 150 нМ, 25 нМ - 100 нМ, 25 нМ - 50 нМ, 50 нМ - 2000 нМ, 50 нМ - 1000 нМ, 50 нМ - 750 нМ, 50 нМ - 500 нМ, 50 нМ - 250 нМ, 50 нМ - 150 нМ, 50 нМ - 100 нМ, 100 нМ - 2000 нМ, 100 нМ - 1000 нМ, 100 нМ - 750 нМ, 100 нМ - 500 нМ, 100 нМ - 250 нМ, 100 нМ - 150 нМ, 150 нМ - 2000 нМ, 150 нМ - 1000 нМ, 150 нМ - 750 нМ, 150 нМ - 500 нМ, 150 нМ - 250 нМ, 250 нМ - 2000 нМ, 250 нМ - 1000 нМ, 250 нМ - 750 нМ, 250 нМ - 500 нМ, 500 нМ - 2000 нМ, 500 нМ - 1000 нМ, 500 нМ - 750 нМ, 500 нМ - 500 нМ, 500 нМ - 250 нМ, 500 нМ - 150 нМ, 500 нМ - 100 нМ, 500 нМ - 50 нМ, 750 нМ - 2000 нМ, 750 нМ - 1000 нМ, или 1000 нМ - 2000 нМ.

В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело в активированном состоянии специфически связывает CD71 млекопитающих с константой диссоциации, меньшей или равной 0,01 нМ, 0,05 нМ, 0,1 нМ, 0,5 нМ, 1 нМ, 5 нМ или 10 нМ.

В некоторых вариантах осуществления, активируемое антитело в активированном состоянии специфически связывает CD71 млекопитающих с константой диссоциации в диапазоне 0,01 нМ - 100 нМ, 0,01 нМ - 10 нМ, 0,01 нМ - 5 нМ, 0,01 нМ - 1 нМ, 0,01-0,5 нМ, 0,01 нМ - 0,1 нМ, 0,01 нМ - 0,05 нМ, 0,05 нМ - 100 нМ, 0,05 нМ - 10 нМ, 0,05 нМ - 5 нМ, 0,05 нМ - 1 нМ, 0,05 - 0,5 нМ, 0,05 нМ - 0,1 нМ, 0,1 нМ - 100 нМ, 0,1 нМ - 10 нМ, 0,1 нМ - 5 нМ, 0,1 нМ - 1 нМ, 0,1 нМ - 0,5 нМ, 0,5 нМ - 100 нМ, 0,5 нМ - 10 нМ, 0,5 нМ - 5 нМ, 0,5 нМ - 1 нМ, 1 нМ - 100 нМ, 1 нМ - 10 нМ, 1 нМ - 5 нМ, 5 нМ - 100 нМ, 5 нМ - 10 нМ или 10 нМ - 100 нМ.

В некоторых вариантах осуществления CD71 млекопитающих выбран из группы, состоящей из CD71 человека, CD71 мыши, CD71 крысы и CD71 яванского макака. В некоторых вариантах осуществления АВ специфически связывает CD71 человека, CD71 мыши или CD71 яванского макака с константой диссоциации менее 1 нМ. В некоторых вариантах осуществления CD71 млекопитающих представляет собой CD71 человека.

В некоторых вариантах осуществления АВ обладает одной или несколькими из следующих характеристик: (а) АВ специфически связывает CD71 человека и (b) АВ специфически связывает CD71 человека и CD71 яванского макака.

В некоторых вариантах осуществления АВ обладает одной или несколькими из следующих характеристик:

- (a) АВ специфически связывает CD71 человека и CD71 яванского макака;
- (b) АВ ингибирует связывание трансферрина с CD71 млекопитающих;
- (c) АВ ингибирует связывание трансферрина человека с CD71 человека и
- (d) АВ ингибирует связывание трансферрина яванского макака с CD71 яванского макака.

В некоторых вариантах осуществления АВ блокирует способность природного лиганда связывать CD71 млекопитающих с EC_{50} , меньшей или равной 5 нМ, меньшей или равной 10 нМ, меньшей или равной 50 нМ, меньшей или равной 100 нМ, меньшей или равной 500 нМ и/или меньшей или равной 1000 нМ. В некоторых вариантах осуществления АВ блокирует способность трансферрина связывать CD71 млекопитающих с EC_{50} , меньшей или равной 5 нМ, меньшей или равной 10 нМ, меньшей или равной 50 нМ, меньшей или равной 100 нМ, меньшей или равной 500 нМ и/или меньшей или равной 1000 нМ. В некоторых вариантах осуществления, природный лиганд CD71 представляет собой трансферрин.

В некоторых вариантах осуществления, АВ блокирует способность природного лиганда связывать CD71 млекопитающих с EC_{50} 5 нМ - 1000 нМ, 5 нМ - 500 нМ, 5 нМ - 100 нМ 5 нМ - 50 нМ, 5 нМ - 10 нМ, 10 нМ - 1000 нМ, 10 нМ - 500 нМ, 10 нМ - 100 нМ 10 нМ - 50 нМ, 50 нМ - 1000 нМ, 50 нМ - 500 нМ, 50 нМ - 100 нМ, 100 нМ - 1000 нМ, 100 нМ - 500 нМ, 500 нМ - 1000 нМ. В некоторых вариантах осуществления, АВ блокирует способность трансферрина связывать CD71 млекопитающих с EC_{50} 5 нМ - 1000 нМ, 5 нМ - 500 нМ, 5 нМ - 100 нМ 5 нМ - 50 нМ, 5 нМ - 10 нМ, 10 нМ - 1000 нМ, 10 нМ - 500 нМ, 10 нМ - 100 нМ 10 нМ - 50 нМ, 50 нМ - 1000 нМ, 50 нМ - 500 нМ, 50 нМ - 100 нМ, 100 нМ - 1000 нМ, 100 нМ - 500

цепи (CDR1 VH, CDR2 VH, CDR3 VH), показанных в одной строке в табл. 13.

В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело содержит легкую цепь, содержащую комбинацию последовательности CDR1 VL, последовательности CDR2 VL и последовательности CDR3 VL, где комбинация представляет собой комбинацию из трех последовательностей CDR легкой цепи (CDR1 VL, CDR2 VL, CDR3 VL), показанных в одной строке в табл. 13.

В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело содержит комбинацию последовательности CDR1 VH, последовательности CDR2 VH, последовательности CDR3 VH, последовательности CDR1 VL, последовательности CDR2 VL и последовательности CDR3 VL, где каждая последовательность CDR в комбинации содержит последовательность, по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичную соответствующей последовательности CDR в комбинации из шести последовательностей CDR (CDR1 VH, CDR2 VH, CDR3 VH, CDR1 VL, CDR2 VL, и CDR3 VL), показанных в одной строке в табл. 13.

В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело содержит переменную область тяжелой цепи, содержащую комбинацию последовательности CDR1 VH, последовательности CDR2 VH и последовательности CDR3 VH, где каждая последовательность CDR в комбинации содержит последовательность, по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичную соответствующей последовательности CDR в комбинации из трех последовательностей CDR тяжелой цепи (CDR1 VH, CDR2 VH, CDR3 VH), показанных в одной строке в табл. 13.

В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело содержит переменную область легкой цепи, содержащую комбинацию последовательности CDR1 VL, последовательности CDR2 VL и последовательности CDR3 VL, где каждая последовательность CDR в комбинации содержит последовательность, по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичную соответствующей последовательности CDR в комбинации из трех последовательностей CDR легкой цепи (CDR1 VL, CDR2 VL, CDR3 VL), показанных в одной строке в табл. 13.

В некоторых вариантах осуществления MM обладает константой диссоциации для связывания с АВ, которая является большей, чем константа диссоциации АВ от CD71.

В некоторых вариантах осуществления MM обладает константой диссоциации для связывания с АВ, которая является не большей, чем константа диссоциации АВ от CD71.

В некоторых вариантах осуществления MM обладает константой диссоциации для связывания с АВ, которая является меньшей, чем константа диссоциации АВ от CD71.

В некоторых вариантах осуществления константа диссоциации (K_d) MM по отношению к АВ не более чем в 2, 3, 4, 5, 10, 25, 50, 100, 250, 500, 1000, 2500, 5000, 10000, 50000, 100000, 500000, 1000000, 5000000 раз или более, или в 1-5, 5-10, 10-100, 10-1000, 10-10000, 10-100000, 10-1000000, 10-10000000, 100-1000, 100-10000, 100-100000, 100-1000000, 100-10000000, 1000-10000, 1000-100000, 1000-1000000, 1000-10000000, 10000-100000, 10000-1000000, 10000-10000000, 100000-10000000 раз или более превышает константу диссоциации АВ по отношению к мишени.

В некоторых вариантах осуществления MM не создает помехи или конкуренцию связыванию АВ с CD71, когда активируемое антитело находится в расщепленном состоянии.

В некоторых вариантах осуществления MM представляет собой полипептид длиной приблизительно 2-40 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления MM представляет собой полипептид длиной вплоть до приблизительно 40 аминокислот.

В некоторых вариантах осуществления полипептидная последовательность MM отличается от последовательности CD71. В некоторых вариантах осуществления полипептидная последовательность MM является не более чем на 50% идентичной любому природному партнеру по связыванию АВ. В некоторых вариантах осуществления полипептидная последовательность MM отличается от последовательности CD71 и является не более чем на 40%, 30%, 25%, 20%, 15% или 10% идентичной любому природному партнеру по связыванию АВ.

В некоторых вариантах осуществления присоединение MM к АВ уменьшает способность АВ связывать CD71, так что константа диссоциации (K_d) АВ по отношению к CD71 при присоединении MM по меньшей мере в два раза превышает K_d АВ по отношению к CD71 без присоединения MM.

В некоторых вариантах осуществления присоединение MM к АВ уменьшает способность АВ связывать CD71, так что константа диссоциации (K_d) АВ по отношению к CD71 при присоединении MM по меньшей мере в пять раз превышает K_d АВ по отношению к CD71 без присоединения MM.

В некоторых вариантах осуществления присоединение MM к АВ уменьшает способность АВ связывать CD71, так что константа диссоциации (K_d) АВ по отношению к CD71 при присоединении MM по меньшей мере в 10 раз превышает K_d АВ по отношению к CD71 без присоединения MM.

В некоторых вариантах осуществления присоединение MM к АВ уменьшает способность АВ связывать CD71, так что константа диссоциации (K_d) АВ по отношению к CD71 при присоединении MM по меньшей мере в 20 раз превышает K_d АВ по отношению к CD71 без присоединения MM.

В некоторых вариантах осуществления присоединение MM к АВ уменьшает способность АВ связывать CD71, так что константа диссоциации (K_d) АВ при присоединении MM по отношению к CD71 по меньшей мере в 40 раз превышает K_d АВ по отношению к CD71 без присоединения MM.

В некоторых вариантах осуществления присоединение ММ к АВ уменьшает способность АВ связывать CD71, так что константа диссоциации (K_d) АВ по отношению к CD71 при присоединении ММ по меньшей мере в 100 раз превышает K_d АВ по отношению к CD71 без присоединения ММ.

В некоторых вариантах осуществления присоединение ММ к АВ уменьшает способность АВ связывать CD71, так что константа диссоциации (K_d) АВ по отношению к CD71 при присоединении ММ по меньшей мере в 1000 раз превышает K_d АВ по отношению к CD71 без присоединения ММ.

В некоторых вариантах осуществления присоединение ММ к АВ уменьшает способность АВ связывать CD71, так что константа диссоциации (K_d) АВ по отношению к CD71 при присоединении ММ по меньшей мере в 10000 раз превышает K_d АВ по отношению к CD71 без присоединения ММ.

В некоторых вариантах осуществления в присутствии CD71 ММ уменьшает способность АВ связывать CD71 по меньшей мере на 90%, когда СМ является нерасщепленной, по сравнению с тем, когда СМ является расщепленной, при анализе *in vitro* с использованием анализа вытеснения мишени например, такого как анализ, описанный в Публикации РСТ № WO 2010/081173, полное содержание которой приведено в настоящем документе в качестве ссылки.

В некоторых вариантах осуществления ММ содержит аминокислотную последовательность выбранный из группы, состоящей из SEQ ID NO: 16-295 и 297-314.

В некоторых вариантах осуществления протеаза, расщепляющая СМ, является активной, например, подвергается повышающей регуляции или, в ином случае, не подвергается регуляции в пораженной заболеванием ткани, и протеаза расщепляет СМ в активируемом антителе, когда активируемое антитело подвергают воздействию протеазы.

В некоторых вариантах осуществления протеаза является локализованной совместно с CD71 в ткани, и протеаза расщепляет СМ в активируемом антителе, когда активируемое антитело подвергают воздействию протеазы.

В некоторых вариантах осуществления СМ расположена в активируемом антителе таким образом, что когда активируемое антитело находится в нерасщепленном состоянии, связывание активируемого антитела с CD71 уменьшают, чтобы оно происходило с константой диссоциации, по меньшей мере в два раза превышающей константу диссоциации связывания немодифицированного АВ с CD71, в то время как в расщепленном состоянии (т.е., когда активируемое антитело находится в расщепленном состоянии), АВ связывает CD71.

В некоторых вариантах осуществления СМ расположена в активируемом антителе таким образом, что когда активируемое антитело находится в нерасщепленном состоянии, связывание активируемого антитела с CD71 уменьшают, чтобы оно происходило с константой диссоциации, по меньшей мере в пять раз превышающей константу диссоциации связывания немодифицированного АВ с CD71, в то время как в расщепленном состоянии (т.е., когда активируемое антитело находится в расщепленном состоянии), АВ связывает CD71.

В некоторых вариантах осуществления СМ расположена в активируемом антителе таким образом, что когда активируемое антитело находится в нерасщепленном состоянии, связывание активируемого антитела с CD71 уменьшают, чтобы оно происходило с константой диссоциации, по меньшей мере в 10 раз превышающей константу диссоциации связывания немодифицированного АВ с CD71, в то время как в расщепленном состоянии (т.е., когда активируемое антитело находится в расщепленном состоянии), АВ связывает CD71.

В некоторых вариантах осуществления СМ расположена в активируемом антителе таким образом, что когда активируемое антитело находится в нерасщепленном состоянии, связывание активируемого антитела с CD71 уменьшают, чтобы оно происходило с константой диссоциации, по меньшей мере в 20 раз превышающей константу диссоциации связывания немодифицированного АВ с CD71, в то время как в расщепленном состоянии (т.е., когда активируемое антитело находится в расщепленном состоянии), АВ связывает CD71.

В некоторых вариантах осуществления СМ расположена в активируемом антителе таким образом, что когда активируемое антитело находится в нерасщепленном состоянии, связывание активируемого антитела с CD71 уменьшают, чтобы оно происходило с константой диссоциации, по меньшей мере в 40 раз превышающей константу диссоциации связывания немодифицированного АВ с CD71, в то время как в расщепленном состоянии, АВ связывает CD71.

В некоторых вариантах осуществления СМ расположена в активируемом антителе таким образом, что когда активируемое антитело находится в нерасщепленном состоянии, связывание активируемого антитела с CD71 уменьшают, чтобы оно происходило с константой диссоциации, по меньшей мере в 50 раз превышающей константу диссоциации связывания немодифицированного АВ с CD71, в то время как в расщепленном состоянии АВ связывает CD71.

В некоторых вариантах осуществления СМ расположена в активируемом антителе таким образом, что когда активируемое антитело находится в нерасщепленном состоянии, связывание активируемого антитела с CD71 уменьшают, чтобы оно происходило с константой диссоциации, по меньшей мере в 100 раз превышающей константу диссоциации связывания немодифицированного АВ с CD71, в то время как в расщепленном состоянии АВ связывает CD71.

В некоторых вариантах осуществления СМ расположена в активируемом антителе таким образом, что когда активируемое антитело находится в нерасщепленном состоянии, связывание активируемого антитела с CD71 уменьшают, чтобы оно происходило с константой диссоциации, по меньшей мере в 200 раз превышающей константу диссоциации связывания немодифицированного АВ с CD71, в то время как в расщепленном состоянии, АВ связывает CD71.

В некоторых вариантах осуществления СМ представляет собой полипептид длиной вплоть до 15 аминокислот.

В некоторых вариантах осуществления СМ представляет собой полипептид, который содержит первую расщепляемую группу (СМ1), являющуюся субстратом для по меньшей мере одной матриксной металлопротеиназы (ММР), и вторую расщепляемую группу (СМ2), являющуюся субстратом для по меньшей мере одной сериновой протеазы (SP). В некоторых вариантах осуществления каждая из субстратной последовательности СМ1 субстратной последовательности и субстратной последовательности СМ2 субстрата СМ1-СМ2 независимо представляет собой полипептид длиной вплоть до 15 аминокислот.

В некоторых вариантах осуществления СМ является субстратом для по меньшей мере одной протеазы, которая подвергается или, как считают, подвергается повышающей регуляции или, в ином случае, не подвергается регуляции в злокачественной опухоли.

В некоторых вариантах осуществления СМ является субстратом для по меньшей мере одной протеазы, выбранной из группы, состоящей из матриксной металлопротеиназы (ММР), тромбина, эластазы нейтрофилов, цистеиновой протеазы, лемуина и сериновой протеазы, такой как матриптаза (MT-SP1) и урокиназа (uPA). Без связи с теорией считают, что эти протеазы подвергаются повышающей регуляции или, в ином случае не подвергаются регуляции по меньшей мере в одном типе злокачественных опухолей.

Иллюстративные субстраты включают в себя, но без ограничения, субстраты, расщепляемые одним или несколькими из следующих ферментов или протеаз, перечисленных в табл. 4.

В некоторых вариантах осуществления СМ выбирают для использования с конкретной протеазой, например с протеазой, как известно, локализованной совместно с мишенью активируемого антитела.

В некоторых вариантах осуществления СМ является субстратом для по меньшей мере одной ММР. Примеры ММР включают в себя ММР, перечисленные в табл. 4. В некоторых вариантах осуществления СМ является субстратом для протеазы, выбранной из группы, состоящей из ММР 9, ММР14, ММР1, ММР3, ММР13, ММР17, ММР11 и ММР19. В некоторых вариантах осуществления СМ является субстратом для ММР9. В некоторых вариантах осуществления СМ является субстратом для ММР14.

В некоторых вариантах осуществления СМ представляет собой субстрат, содержащий последовательность TGRGPSWV (SEQ ID NO: 356); SARGPSRW (SEQ ID NO: 357); TARGPSFK (SEQ ID NO: 358); LSGRSDNH (SEQ ID NO: 359); GGWHTGRN (SEQ ID NO: 360); HTGRSGAL (SEQ ID NO: 361); PLTGRSGG (SEQ ID NO: 362); AARGPAIH (SEQ ID NO: 363); RGPANPM (SEQ ID NO: 364); SSRGPAYL (SEQ ID NO: 365); RGPATPIM (SEQ ID NO: 366); RGA (SEQ ID NO: 367); GGQPSGMWGW (SEQ ID NO: 368); FPRPLGITGL (SEQ ID NO: 369); VHMPGLGFLGP (SEQ ID NO: 370); SPLTGRSG (SEQ ID NO: 371); SAGFSLPA (SEQ ID NO: 372); LAPLGLQRR (SEQ ID NO: 373); SGGPLGVR (SEQ ID NO: 374); PLGL (SEQ ID NO: 375); LSGRSGNH (SEQ ID NO: 789); SGRSANPRG (SEQ ID NO: 790); LSGRSDDH (SEQ ID NO: 791); LSGRSDIH (SEQ ID NO: 792); LSGRSDQH (SEQ ID NO: 793); LSGRSDTH (SEQ ID NO: 794); LSGRSDYH (SEQ ID NO: 795); LSGRSDNP (SEQ ID NO: 796); LSGRSANP (SEQ ID NO: 797); LSGRSANI (SEQ ID NO: 798); LSGRSDNI (SEQ ID NO: 799); MIAPVAYR (SEQ ID NO: 800); RPSPMWAY (SEQ ID NO: 801); WATPRPMR (SEQ ID NO: 802); FRLLDWQW (SEQ ID NO: 803); ISSGL (SEQ ID NO: 804); ISSGLLS (SEQ ID NO: 805) и/или ISSGLL (SEQ ID NO: 806).

В некоторых вариантах осуществления СМ содержит аминокислотную последовательность LSGRSDNH (SEQ ID NO: 359). В некоторых вариантах осуществления СМ содержит аминокислотную последовательность TGRGPSWV (SEQ ID NO: 356). В некоторых вариантах осуществления СМ содержит аминокислотную последовательность PLTGRSGG (SEQ ID NO: 362). В некоторых вариантах осуществления СМ содержит аминокислотную последовательность GGQPSGMWGW (SEQ ID NO: 368). В некоторых вариантах осуществления СМ содержит аминокислотную последовательность FPRPLGITGL (SEQ ID NO: 369). В некоторых вариантах осуществления СМ содержит аминокислотную последовательность VHMPGLGFLGP (SEQ ID NO: 370). В некоторых вариантах осуществления СМ содержит аминокислотную последовательность PLGL (SEQ ID NO: 375). В некоторых вариантах осуществления СМ содержит аминокислотную последовательность SARGPSRW (SEQ ID NO: 357). В некоторых вариантах осуществления СМ содержит аминокислотную последовательность TARGPSFK (SEQ ID NO: 358). В некоторых вариантах осуществления СМ содержит аминокислотную последовательность GGWHTGRN (SEQ ID NO: 360). В некоторых вариантах осуществления СМ содержит аминокислотную последовательность HTGRSGAL (SEQ ID NO: 361). В некоторых вариантах осуществления СМ содержит аминокислотную последовательность AARGPAIH (SEQ ID NO: 363). В некоторых вариантах осуществления СМ содержит аминокислотную последовательность RGPANPM (SEQ ID NO: 364). В некоторых вариантах осуществления СМ содержит аминокислотную последовательность SSRGPAYL (SEQ ID NO: 365). В некоторых вариантах осуществления СМ содержит аминокислотную последовательность RGPATPIM

NTLSGRSENHSG (SEQ ID NO: 395). В некоторых вариантах осуществления CM содержит аминокислотную последовательность NTLSGRSGNHGS (SEQ ID NO: 396). В некоторых вариантах осуществления CM содержит аминокислотную последовательность TSTSGRSANPRG (SEQ ID NO: 397). В некоторых вариантах осуществления CM содержит аминокислотную последовательность TSGRSANP (SEQ ID NO: 398). В некоторых вариантах осуществления CM содержит аминокислотную последовательность VAGRSMRP (SEQ ID NO: 399). В некоторых вариантах осуществления CM содержит аминокислотную последовательность WPEGRRS (SEQ ID NO: 400). В некоторых вариантах осуществления CM содержит аминокислотную последовательность ILPRSPAF (SEQ ID NO: 401). В некоторых вариантах осуществления CM содержит аминокислотную последовательность MVLGRSLL (SEQ ID NO: 402). В некоторых вариантах осуществления CM содержит аминокислотную последовательность QGRAITFI (SEQ ID NO: 403). В некоторых вариантах осуществления CM содержит аминокислотную последовательность SPRSIMLA (SEQ ID NO: 404). В некоторых вариантах осуществления CM содержит аминокислотную последовательность SMLRSMPL (SEQ ID NO: 405).

В некоторых вариантах осуществления CM является субстратом для эластазы нейтрофилов. В некоторых вариантах осуществления CM является субстратом для сериновой протеазы. В некоторых вариантах осуществления CM является субстратом для иРА. В некоторых вариантах осуществления CM является субстратом для легумаина. В некоторых вариантах осуществления CM является субстратом для матриптазы. В некоторых вариантах осуществления CM является субстратом для цистеиновой протеазы. В некоторых вариантах осуществления CM является субстратом для цистеиновой протеазы, такой как катепсин.

В некоторых вариантах осуществления CM представляет собой субстрат CM1-CM2 и содержит последовательность ISSGLLSGRSDNH (SEQ ID NO: 406); ISSGLLSSGGSGGSLSGRSDNH (SEQ ID NO: 407); AVGLLAPPGGTSTSGRSANPRG (SEQ ID NO: 408); TSTSGRSANPRGGGAVGLLAPP (SEQ ID NO: 409); VHMPGLFLGPGGTSTSGRSANPRG (SEQ ID NO: 410); TSTSGRSANPRGGGVHMPGLFLGP (SEQ ID NO: 411); AVGLLAPPGGLSGRSDNH (SEQ ID NO: 412); LSGRSDNHGGAVGLLAPP (SEQ ID NO: 413); VHMPGLFLGPGGLSGRSDNH (SEQ ID NO: 414); LSGRSDNHGGVHMPGLFLGP (SEQ ID NO: 415); LSGRSDNHGGSGGSISSGLLSS (SEQ ID NO: 416); LSGRSGNHGGSGGSISSGLLSS (SEQ ID NO: 417); ISSGLLSSGGSGGSLSGRSGNH (SEQ ID NO: 418); LSGRSDNHGGSGGSQLRMA (SEQ ID NO: 419); QNQLRMAGGSGGSLSGRSDNH (SEQ ID NO: 420); LSGRSGNHGGSGGSQLRMA (SEQ ID NO: 421); QNQLRMAGGSGGSLSGRSGNH (SEQ ID NO: 422); ISSGLLSGRSGNH (SEQ ID NO: 423); ISSGLLSGRSANPRG (SEQ ID NO: 680); AVGLLAPPTSGRSANPRG (SEQ ID NO: 681); AVGLLAPPSGRSANPRG (SEQ ID NO: 682); ISSGLLSGRSDDH (SEQ ID NO: 683); ISSGLLSGRSDIH (SEQ ID NO: 684); ISSGLLSGRSDQH (SEQ ID NO: 685); ISSGLLSGRSDTH (SEQ ID NO: 686); ISSGLLSGRSDYH (SEQ ID NO: 687); ISSGLLSGRSDNP (SEQ ID NO: 688); ISSGLLSGRSANP (SEQ ID NO: 689); ISSGLLSGRSANI (SEQ ID NO: 690); AVGLLAPPGGLSGRSDDH (SEQ ID NO: 691); AVGLLAPPGGLSGRSDIH (SEQ ID NO: 692); AVGLLAPPGGLSGRSDQH (SEQ ID NO: 693); AVGLLAPPGGLSGRSDTH (SEQ ID NO: 694); AVGLLAPPGGLSGRSDYH (SEQ ID NO: 695); AVGLLAPPGGLSGRSDNP (SEQ ID NO: 696); AVGLLAPPGGLSGRSANP (SEQ ID NO: 697); AVGLLAPPGGLSGRSANI (SEQ ID NO: 698); ISSGLLSGRSDNI (SEQ ID NO: 713); AVGLLAPPGGLSGRSDNI (SEQ ID NO: 714); GLSGRSDNHGGAVGLLAPP (SEQ ID NO: 807) и/или GLSGRSDNHGGVHMPGLFLGP (SEQ ID NO: 808).

В некоторых вариантах осуществления субстрат CM1-CM2 содержит последовательность ISSGLLSGRSDNH (SEQ ID NO: 406), также обозначаемую в настоящем документе как субстрат 2001. В некоторых вариантах осуществления субстрат CM1-CM2 содержит последовательность ISSGLLSSGGSGGSLSGRSDNH (SEQ ID NO: 407), также обозначаемую в настоящем документе как субстрат 1001/LP'/0001, где LP', как применяют в этом субстрате CM1-CM2, представляет собой аминокислотную последовательность GSGGS (SEQ ID NO: 1037). В некоторых вариантах осуществления субстрат CM1-CM2 содержит последовательность AVGLLAPPGGTSTSGRSANPRG (SEQ ID NO: 408), также обозначаемую в настоящем документе как субстрат 2015 и/или субстрат 1004/LP'/0003, где LP', как применяют в этом субстрате CM1-CM2, представляет собой аминокислотную последовательность GG. В некоторых вариантах осуществления субстрат CM1-CM2 содержит последовательность TSTSGRSANPRGGGAVGLLAPP (SEQ ID NO: 409), также обозначаемую в настоящем документе как субстрат 0003/LP'/1004, где LP', как применяют в этом субстрате CM1-CM2, представляет собой аминокислотную последовательность GG. В некоторых вариантах осуществления субстрат CM1-CM2 содержит последовательность VHMPGLFLGPGGTSTSGRSANPRG (SEQ ID NO: 410), также обозначаемую в настоящем документе как субстрат 1003/LP'/0003, где LP', как применяют в этом субстрате CM1-CM2, представляет собой аминокислотную последовательность GG. В некоторых вариантах осуществления субстрат CM1-CM2 содержит последовательность TSTSGRSANPRGGGVHMPGLFLGP (SEQ ID NO: 411), также обозначаемую в настоящем документе как субстрат 0003/LP'/1003, где LP', как применяют в этом субстрате CM1-CM2, представляет собой аминокислотную последовательность GG. В некоторых вариантах осуществления субстрат CM1-CM2 содержит последовательность AVGLLAPPGGLSGRSDNH (SEQ ID NO: 412), также обозначаемую в настоящем документе как субстрат 3001 и/или субстрат

чаемую в настоящем документе как субстрат 3007. В некоторых вариантах осуществления субстрат CM1-CM2 содержит последовательность AVGLLAPPGGLSGRSDQH (SEQ ID NO: 693), также обозначаемую в настоящем документе как субстрат 3008. В некоторых вариантах осуществления субстрат CM1-CM2 содержит последовательность AVGLLAPPGGLSGRSDTH (SEQ ID NO: 694), также обозначаемую в настоящем документе как субстрат 3009. В некоторых вариантах осуществления субстрат CM1-CM2 содержит последовательность AVGLLAPPGGLSGRSDYH (SEQ ID NO: 695), также обозначаемую в настоящем документе как субстрат 3010. В некоторых вариантах осуществления субстрат CM1-CM2 содержит последовательность AVGLLAPPGGLSGRSDNP (SEQ ID NO: 696), также обозначаемую в настоящем документе как субстрат 3011. В некоторых вариантах осуществления субстрат CM1-CM2 содержит последовательность AVGLLAPPGGLSGRSANP (SEQ ID NO: 697), также обозначаемую в настоящем документе как субстрат 3012. В некоторых вариантах осуществления субстрат CM1-CM2 содержит последовательность AVGLLAPPGGLSGRSANI (SEQ ID NO: 698), также обозначаемую в настоящем документе как субстрат 3013. В некоторых вариантах осуществления субстрат CM1-CM2 содержит последовательность ISSGLLSGRSDNI (SEQ ID NO: 713), также обозначаемую в настоящем документе как субстрат 2014. В некоторых вариантах осуществления субстрат CM1-CM2 содержит последовательность AVGLLAPPGGLSGRSDNI (SEQ ID NO: 714), также обозначаемую в настоящем документе как субстрат 3014. В некоторых вариантах осуществления субстрат CM1-CM2 содержит последовательность GLSGRSDNHGGAVGLLAPP (SEQ ID NO: 807), также обозначаемую в настоящем документе как субстрат 0001/LP'/1004, где LP', как применяют в этом субстрате CM1-CM2, представляет собой аминокислотную последовательность GG. В некоторых вариантах осуществления субстрат CM1-CM2 содержит последовательность GLSGRSDNHGGVHMPLGFLGP (SEQ ID NO: 808), также обозначаемую в настоящем документе как субстрат 0001/LP'/1003, where LP', как применяют в этом субстрате CM1-CM2, представляет собой аминокислотную последовательность GG.

В некоторых вариантах осуществления CM является субстратом для по меньшей мере двух протеаз. В некоторых вариантах осуществления, каждая протеаза выбрана из группы, состоящей из протеаз, показанных в табл. 4. В некоторых вариантах осуществления CM является субстратом для по меньшей мере двух протеаз, где одна из протеаз выбрана из группы, состоящей из MMP, тромбина, эластазы нейтрофилов, цистеиновой протеазы, uPA, легумаина и матриптазы, и другая протеаза выбрана из группы, состоящей из протеаз, показанных в табл. 4. В некоторых вариантах осуществления CM является субстратом для по меньшей мере двух протеаз, выбранных из группы, состоящей из MMP, тромбина, эластазы нейтрофилов, цистеиновой протеазы, uPA, легумаина и матриптазы.

В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело содержит, по меньшей мере, первую CM и вторую CM. В некоторых вариантах осуществления каждая из первой CM и второй CM представляют собой полипептиды длиной не более 15 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления первая CM и вторая CM в активируемом антителе в нерасщепленном состоянии обладают следующей структурной аранжировкой от N-конца к C-концу: MM-CM1-CM2-AB или AB-CM2-CM1-MM. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одна из первой CM и второй CM представляет собой полипептид, функционирующий в качестве субстрата для протеазы, выбранной из группы, состоящей из MMP, тромбина, эластазы нейтрофилов, цистеиновой протеазы, uPA, легумаина и матриптазы. В некоторых вариантах осуществления первую CM расщепляют посредством первого расщепляющего средства, выбранного из группы, состоящей из MMP, тромбина, эластазы нейтрофилов, цистеиновой протеазы, uPA, легумаина и матриптазы в ткани-мишени, и вторую CM расщепляют посредством второго расщепляющего средства в ткани-мишени. В некоторых вариантах осуществления другая протеаза выбрана из группы, состоящей из протеаз, показанных в таблице 4. В некоторых вариантах осуществления первое расщепляющее средство и второе расщепляющее средство представляют собой одну и ту же протеазу, выбранную из группы, состоящей из MMP, тромбина, эластазы нейтрофилов, цистеиновой протеазы, uPA, легумаина и матриптазы, и первая CM и вторая CM представляют собой различные субстраты для фермента. В некоторых вариантах осуществления первое расщепляющее средство и второе расщепляющее средство представляют собой одну и ту же протеазу, выбранную из группы, состоящей из протеаз, показанных в табл. 4. В некоторых вариантах осуществления первое расщепляющее средство и второе расщепляющее средство представляют собой различные протеазы. В некоторых вариантах осуществления первое расщепляющее средство и второе расщепляющее средство локализованы совместно в ткани-мишени. В некоторых вариантах осуществления первая CM и вторая CM расщепляются посредством по меньшей мере одного расщепляющего средства в ткани-мишени.

В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело подвергают воздействию протеазы и расщеплению протеазой таким образом, что в активированном или расщепленном состоянии активированное антитело содержит аминокислотную последовательность легкой цепи, содержащую по меньшей мере часть последовательности LP2 и/или CM после расщепления CM протеазой.

Пригодные активируемые антитела против CD71 по этому описанию включают в себя также антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, связывающие тот же самый эпипот на CD71 человека и/или CD71 яванского макака, что и антитело против CD71, содержащее аминокислотную последовательность варибельной области тяжелой цепи, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1 и 3-5, и амино-

кислотную последовательность вариабельной области легкой цепи, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2 и 6-8.

Пригодные активируемые антитела против CD71 по этому описанию включают в себя также антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, связывающие тот же самый эпитоп на CD71 человека и/или CD71 яванского макака, что и антитело против CD71, содержащее последовательность CDR1 VH, содержащую аминокислотную последовательность GYTFTSYWMH (SEQ ID NO: 9); последовательность CDR2 VH, содержащую аминокислотную последовательность AIYPGNSETG (SEQ ID NO: 10); последовательность CDR3 VH, содержащую аминокислотную последовательность ENWDPGFAF (SEQ ID NO: 11); последовательность CDR1 VL, содержащую аминокислотную последовательность SASSSVYYMY (SEQ ID NO: 12) или CRASSSVYYMY (SEQ ID NO: 13); последовательность CDR2 VL, содержащую аминокислотную последовательность STSNLAS (SEQ ID NO: 14); и последовательность CDR3 VL, содержащую аминокислотную последовательность QQRNYPYT (SEQ ID NO: 15).

Пригодные активируемые антитела против CD71 по этому описанию включают в себя также антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, связывающие тот же самый эпитоп на CD71 человека и/или CD71 яванского макака, что и антитело против CD71, содержащее аминокислотную последовательность вариабельной области тяжелой цепи, выбранную из группы, состоящей из последовательностей вариабельной области тяжелой цепи, показанных в табл. 12, и аминокислотную последовательность вариабельной области легкой цепи, выбранную из группы, состоящей из последовательностей вариабельной области легкой цепи, показанных в табл. 12.

Пригодные активируемые антитела против CD71 по этому описанию включают в себя также антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, связывающие тот же самый эпитоп на CD71 человека и/или CD71 яванского макака, что и антитело против CD71, содержащее комбинацию последовательности CDR1 VH, последовательности CDR2 VH, последовательности CDR3 VH, последовательности CDR1 VL, последовательности CDR2 VL и последовательности CDR3 VL, где комбинация представляет собой комбинацию из шести последовательностей CDR (CDR1 VH, CDR2 VH, CDR3 VH, CDR1 VL, CDR2 VL, и CDR3 VL), показанных в одной строке в табл. 13.

Пригодные активируемые антитела против CD71 по этому описанию включают в себя также антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, перекрестно конкурирующие за связывание с CD71 человека и/или CD71 яванского макака с антителом против CD71, содержащим аминокислотную последовательность вариабельной области тяжелой цепи, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1 и 3-5, и аминокислотную последовательность вариабельной области легкой цепи, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2 и 6-8.

Пригодные активируемые антитела против CD71 по этому описанию включают в себя также антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, перекрестно конкурирующие за связывание с CD71 человека и/или CD71 яванского макака с антителом против CD71, содержащим последовательность CDR1 VH, содержащую аминокислотную последовательность GYTFTSYWMH (SEQ ID NO: 9); последовательность CDR2 VH, содержащую аминокислотную последовательность AIYPGNSETG (SEQ ID NO: 10); последовательность CDR3 VH, содержащую аминокислотную последовательность ENWDPGFAF (SEQ ID NO: 11); последовательность CDR1 VL, содержащую аминокислотную последовательность SASSSVYYMY (SEQ ID NO: 12) или CRASSSVYYMY (SEQ ID NO: 13); последовательность CDR2 VL, содержащую аминокислотную последовательность STSNLAS (SEQ ID NO: 14); и последовательность CDR3 VL, содержащую аминокислотную последовательность QQRNYPYT (SEQ ID NO: 15).

Пригодные активируемые антитела против CD71 по этому описанию включают в себя также антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, перекрестно конкурирующие за связывание с CD71 человека и/или CD71 яванского макака с антителом против CD71, содержащим аминокислотную последовательность вариабельной области тяжелой цепи, выбранную из группы, состоящей из последовательностей вариабельной области тяжелой цепи, показанных в табл. 12, и аминокислотную последовательность вариабельной области легкой цепи, выбранную из группы, состоящей из последовательностей вариабельной области легкой цепи, показанных в табл. 12.

Пригодные активируемые антитела против CD71 по этому описанию включают в себя также антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, перекрестно конкурирующие за связывание с CD71 человека и/или CD71 яванского макака с антителом против CD71, содержащим комбинацию последовательности CDR1 VH, последовательности CDR2 VH, последовательности CDR3 VH, последовательности CDR1 VL, последовательности CDR2 VL и последовательности CDR3 VL, где комбинация представляет собой комбинацию из шести последовательностей CDR (CDR1 VH, CDR2 VH, CDR3 VH, CDR1 VL, CDR2 VL, и CDR3 VL), показанных в одной строке в табл. 13.

В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело против CD71 представляет собой активируемое антитело, которое в активированном состоянии связывает CD71, содержащее антитело или его антигенсвязывающий фрагмент (AB) специфически связывающие CD71 млекопитающих, где AB специфически связывает CD71 человека и CD71 яванского макака; маскирующую группу (ММ), ингибирующую связывание АВ с CD71, когда активируемое антитело находится в нерасщепленном состоянии; и расщепляемую группу (СМ), присоединенную к АВ, где СМ представляет собой полипептид, функ-

ционирующий в качестве субстрата для протеазы.

В некоторых вариантах осуществления ММ обладает константой диссоциации для связывания с АВ, превышающей константу диссоциации АВ от CD71. В некоторых вариантах осуществления ММ не создает помехи или конкуренцию для связывания АВ с CD71, когда активируемое антитело находится в расщепленном состоянии. В некоторых вариантах осуществления ММ представляет собой полипептид длиной не более 40 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления полипептидная последовательность ММ отличается от последовательности CD71 человека. В некоторых вариантах осуществления полипептидная последовательность ММ является не более чем на 50% идентичной любому природному партнеру по связыванию АВ. В некоторых вариантах осуществления ММ содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 16-295 и 297-314. В некоторых вариантах осуществления ММ содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 16, 17 и 297-314.

В некоторых вариантах осуществления СМ является субстратом для протеазы, являющейся активной в поражении заболеванием ткани. В некоторых вариантах осуществления СМ содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 356-423, 680-698, 713, 714 и 789-808. В некоторых вариантах осуществления СМ содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 406-423, 680-698, 713, 714 и 807-808.

В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело содержит его антигенсвязывающий фрагмент, выбранный из группы, состоящей из фрагмента Fab, фрагмента F(ab')₂, scFv, scAb, dAb, антитела из одиночного домена тяжелой цепи и антитела из одиночного домена легкой цепи. В некоторых вариантах осуществления АВ активируемого антитела специфически связывает CD71 человека. В некоторых вариантах осуществления АВ содержит последовательность CDR1 VH GYTFTSYWMH (SEQ ID NO: 9); последовательность CDR2 VH AIYPGNSETG (SEQ ID NO: 10); последовательность CDR3 VH ENWDPGFAF (SEQ ID NO: 11); последовательность CDR1 VL SASSSVYYMY (SEQ ID NO: 12) или CRASSSVYYMY (SEQ ID NO: 13); последовательность CDR2 VL STSNLAS (SEQ ID NO: 14) и последовательность CDR3 VL QQRNYPYT (SEQ ID NO: 15). В некоторых вариантах осуществления АВ содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 3-5, и вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 6-8 и 809-908.

В некоторых вариантах осуществления АВ является связанным с СМ. В некоторых вариантах осуществления АВ является связанным непосредственно с СМ. В некоторых вариантах осуществления АВ является связанным с СМ через связывающий пептид. В некоторых вариантах осуществления ММ является связанной с СМ, так что активируемое антитело в нерасщепленном состоянии обладает следующей структурной аранжировкой от N-конца к C-концу: ММ-СМ-АВ или АВ-СМ-ММ. В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело содержит связывающий пептид между ММ и СМ. В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело содержит связывающий пептид между СМ и АВ. В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело содержит первый связывающий пептид (LP1) и второй связывающий пептид (LP2), и где активируемое антитело в нерасщепленном состоянии обладает следующей структурной аранжировкой от N-конца к C-концу: ММ-LP1-СМ-LP2-АВ или АВ-LP2-СМ-LP1-ММ. В некоторых вариантах осуществления два связывающих пептида не обязательно должны быть идентичны друг другу. В некоторых вариантах осуществления каждый из LP1 и LP2 представляет собой пептид длиной приблизительно 1-20 аминокислот.

В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело содержит последовательность тяжелой цепи из SEQ ID NO: 325 или 699 и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 327, 329, 331, 333, 335, 337, 650, 652, 654, 656, 658, 660, 670-673, 701-712, 721-788, 809-836 и 841-908.

В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело содержит комбинацию аминокислотных последовательностей, где комбинация аминокислотных последовательностей выбрана из одной строки в табл. D, где для данной комбинации, (a) тяжелая цепь АВ содержит аминокислотные последовательности из последовательностей CDR VH, соответствующих данной комбинации в одной строке, перечисленных в табл. D, (b) легкая цепь АВ содержит аминокислотные последовательности из последовательностей CDR VL, соответствующих данной комбинации в одной строке, перечисленных в табл. D, (c) ММ содержит аминокислотную последовательность из маскирующих последовательностей (ММ), соответствующих данной комбинации в одной строке, перечисленных в табл. D, и (d) СМ содержит аминокислотную последовательность из субстратных последовательностей (СМ), соответствующих данной комбинации в одной строке, перечисленных в табл. D.

В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело содержит комбинацию аминокислотных последовательностей, где для данной комбинации аминокислотных последовательностей, (a) тяжелая цепь АВ содержит аминокислотные последовательности из последовательности VH или последовательностей CDR VH, выбранных из группы, состоящей из: последовательности VH или последовательностей CDR VH, перечисленных в соответствующем столбце табл. E, (b) легкая цепь АВ содержит аминокислотные последовательности из последовательности VL или последовательностей CDR VL, вы-

бранных из группы, состоящей из: последовательности VL или последовательностей CDR VL, перечисленных в соответствующем столбце табл. E, (c) MM содержит аминокислотную последовательность из маскирующих последовательностей (MM), выбранных из группы, состоящей из: последовательностей MM, перечисленных в соответствующем столбце таблицы E, и (d) CM содержит аминокислотную последовательность из субстратной последовательности (CM), выбранной из группы, состоящей из: последовательностей CM, перечисленных в соответствующем столбце табл. E.

В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело против CD71 содержит антитело или его антигенсвязывающий фрагмент (AB) специфически связывающие CD71 млекопитающих, MM и CM, где активируемое антитело содержит: последовательность тяжелой цепи из SEQ ID NO: 325 или 699; и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 327, 329, 331, 333, 335, 337, 650, 652, 654, 656, 658, 660, 670-673, 701-712, 721-788, 809-836 и 841-908. В некоторых вариантах осуществления, MM содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 16, 17 и 297-314, и CM содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 406-423, 680-698, 713, 714 и 789-808. В некоторых вариантах осуществления, AB содержит последовательность CDR1 VH GYTFTSYWMH (SEQ ID NO: 9); последовательность CDR2 VH AIYPGNSETG (SEQ ID NO: 10); последовательность CDR3 VH ENWDPGFAF (SEQ ID NO: 11); последовательность CDR1 VL SASSSVYYMY (SEQ ID NO: 12) или CRASSSVYYMY (SEQ ID NO: 13); последовательность CDR2 VL STSNLAS (SEQ ID NO: 14) и последовательность CDR3 VL QQRNYPYT (SEQ ID NO: 15). В некоторых вариантах осуществления AB содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 3-5, и вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 6-8 и 809-908.

В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело против CD71 содержит антитело или его антигенсвязывающий фрагмент (AB), специфически связывающие CD71 млекопитающих, MM, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 16-295 и 297-314, и CM, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 356-423, 680-698, 713, 714 и 789-808. В некоторых вариантах осуществления MM содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 16, 17 и 297-314, и CM содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 406-423, 680-698, 713, 714 и 807-808. В некоторых вариантах осуществления, AB содержит последовательность CDR1 VH GYTFTSYWMH (SEQ ID NO: 9); последовательность CDR2 VH AIYPGNSETG (SEQ ID NO: 10); последовательность CDR3 VH ENWDPGFAF (SEQ ID NO: 11); последовательность CDR1 VL SASSSVYYMY (SEQ ID NO: 12) или CRASSSVYYMY (SEQ ID NO: 13); последовательность CDR2 VL STSNLAS (SEQ ID NO: 14); и последовательность CDR3 VL QQRNYPYT (SEQ ID NO: 15). В некоторых вариантах осуществления, AB содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 3-5, и вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 6-8 и 809-908.

В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело против CD71 содержит антитело или его антигенсвязывающий фрагмент (AB), специфически связывающие CD71 млекопитающих, где AB специфически связывает тот же самый эпитоп на CD71 человека и/или CD71 яванского макака, что и выделенное антитело по этому описанию; маскирующую группу (MM) ингибирующую связывание AB с CD71, когда активируемое антитело находится в нерасщепленном состоянии; и расщепляемую группу (CM) присоединенную к AB, где CM представляет собой полипептид, функционирующий в качестве субстрата для протеазы.

В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело против CD71 по этому описанию содержит выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент (AB), специфически связывающие CD71 млекопитающих, где AB специфически связывает CD71 человека и CD71 яванского макака. В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит последовательность CDR1 VH GYTFTSYWMH (SEQ ID NO: 9); последовательность CDR2 VH AIYPGNSETG (SEQ ID NO: 10); последовательность CDR3 VH ENWDPGFAF (SEQ ID NO: 11); последовательность CDR1 VL SASSSVYYMY (SEQ ID NO: 12) или CRASSSVYYMY (SEQ ID NO: 13); последовательность CDR2 VL STSNLAS (SEQ ID NO: 14); и последовательность CDR3 VL QQRNYPYT (SEQ ID NO: 15). В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 3-5, и вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 6-8.

В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело против CD71 содержит антитело или его антигенсвязывающий фрагмент (AB), специфически связывающие CD71 млекопитающих, где AB проявляет специфическую перекрестную конкуренцию с выделенным антителом по этому описанию для связывания с CD71 человека и/или CD71 яванского макака; маскирующую группу (MM), ингиби-

рующую связывание АВ с CD71, когда активируемое антитело находится в нерасщепленном состоянии; и расщепляемую группу (СМ) присоединенную к АВ, где СМ представляет собой полипептид, функционирующий в качестве субстрата для протеазы.

В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело против CD71 по этому описанию содержит выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент (АВ), специфически связывающие CD71 млекопитающих, где АВ специфически связывает CD71 человека и CD71 яванского макака. В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит последовательность CDR1 VH GYTFTSYWMH (SEQ ID NO: 9); последовательность CDR2 VH AIYPGNSETG (SEQ ID NO: 10); последовательность CDR3 VH ENWDPGFAF (SEQ ID NO: 11); последовательность CDR1 VL SASSSVYYMY (SEQ ID NO: 12) или CRASSSVYYMY (SEQ ID NO: 13); последовательность CDR2 VL STSNLAS (SEQ ID NO: 14); и последовательность CDR3 VL QQRRNYPYT (SEQ ID NO: 15). В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 3-5, и вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 6-8.

В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело содержит также средство, конъюгированное с АВ. В некоторых вариантах осуществления средство, конъюгированное с АВ или АВ активируемого антитела, представляет собой лекарственное средство. В некоторых вариантах осуществления средство представляет собой ап антинеопластическое средство. В некоторых вариантах осуществления средство представляет собой токсин или его фрагмент. Как применяют в настоящем документе, фрагмент токсина представляет собой фрагмент, сохраняющий токсическую активность. В некоторых вариантах осуществления средство является конъюгированным с АВ посредством расщепляемого линкера. В некоторых вариантах осуществления средство является конъюгированным с АВ посредством линкера, содержащего по меньшей мере одну субстратную последовательность СМ1-СМ2. В некоторых вариантах осуществления средство является конъюгированным с АВ посредством нерасщепляемого линкера. В некоторых вариантах осуществления средство является конъюгированным с АВ посредством линкера, расщепляемого во внутриклеточном или лизосомальном окружении. В некоторых вариантах осуществления средство представляет собой ингибитор микротрубочек. В некоторых вариантах осуществления средство представляет собой повреждающее нуклеиновую кислоту средство, такое как алкилирующее ДНК средство, расщепляющее ДНК средство, перекрестно сшивающее ДНК средство, интеркалирующее в ДНК средство или другое повреждающее ДНК средство. В некоторых вариантах осуществления средство представляет собой средство, выбранное из группы перечисленных в табл. 5. В некоторых вариантах осуществления средство представляет собой доластатин. В некоторых вариантах осуществления средство представляет собой ауристин или его производное. В некоторых вариантах осуществления средство представляет собой ауристин Е или его производное. В некоторых вариантах осуществления средство представляет собой монометилауристин (ММАЕ). В некоторых вариантах осуществления средство представляет собой монометилауристин D (ММАD). В некоторых вариантах осуществления средство представляет собой майтанзиноид или производное майтанзиноида. В некоторых вариантах осуществления средство представляет собой DM1 или DM4. В некоторых вариантах осуществления средство представляет собой дуокармицин или его производное. В некоторых вариантах осуществления средство представляет собой калихеамицин или его производное. В некоторых вариантах осуществления средство представляет собой пирролобензодиазепин. В некоторых вариантах осуществления средство представляет собой димер пирролобензодиазепина.

В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело является конъюгированным с одним или несколькими эквивалентами средства. В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело является конъюгированным с одним эквивалентом средства. В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело является конъюгированным с двумя, тремя, четырьмя, пятью, шестью, семью, восемью, девятью, десятью или более, чем десятью эквивалентами средства. В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело является частью смеси активируемых антител, обладающих одинаковым количеством эквивалентов конъюгированных средств. В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело является частью смеси активируемых антител, обладающих неодинаковым количеством эквивалентов конъюгированных средств. В некоторых вариантах осуществления смесь активируемых антител является такой, что среднее количество средств, конъюгированных с каждым активируемым антителом составляет между нулем и одним, между одним и двумя, между двумя и тремя, между тремя и четырьмя, между четырьмя и пятью, между пятью и шестью, между шестью и семью, между семью и восемью, между восемью и девятью, между девятью и десятью, и десятью и более. В некоторых вариантах осуществления смесь активируемых антител является такой, что среднее количество средств, конъюгированных с каждым активируемым антителом, составляет один, два, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять, десять или более.

В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело содержит одну или несколько сайт-специфических модификаций аминокислотной последовательности, так что количество остатков лизина и/или цистеина увеличивают или уменьшают по отношению к исходной аминокислотной последователь-

ности активируемого антитела, таким образом, в некоторых вариантах осуществления соответственно увеличивая или уменьшая количество средств, которые можно конъюгировать с активируемым антителом, или в некоторых вариантах осуществления, ограничивая конъюгацию средств с активируемым антителом сайт-специфическим образом. В некоторых вариантах осуществления модифицированное активируемое антитело модифицируют с использованием одной или нескольких неприродных аминокислот сайт-специфическим образом, таким образом в некоторых вариантах осуществления, ограничивая конъюгацию средств только участками неприродных аминокислот.

В некоторых вариантах осуществления средство представляет собой противовоспалительное средство.

В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело содержит также поддающуюся детекции группу. В некоторых вариантах осуществления поддающаяся детекции группа представляет собой диагностическое средство.

В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело содержит также сигнальный пептид. В некоторых вариантах осуществления сигнальный пептид является конъюгированным с активируемым антителом посредством спейсера. В некоторых вариантах осуществления спейсер является конъюгированным с активируемым антителом в отсутствие сигнального пептида. В некоторых вариантах осуществления спейсер присоединяют непосредственно к ММ активируемого антитела. В некоторых вариантах осуществления спейсер присоединяют непосредственно к ММ активируемого антитела в структурной аранжировке от N-конца к C-концу спейсер-ММ-СМ-АВ. Примером спейсера, присоединенного непосредственно к N-концу ММ активируемого антитела, является QGQSGQ (SEQ ID NO: 424). Другие примеры спейсера, присоединенного непосредственно к N-концу ММ активируемого антитела, включают в себя QGQSGQG (SEQ ID NO: 645), QGQSG (SEQ ID NO: 646), QGQS (SEQ ID NO: 647), QGQ (SEQ ID NO: 648), QG (SEQ ID NO: 649) и Q. Другие примеры спейсера, присоединенного непосредственно к N-концу ММ активируемого антитела, включают в себя GQSGQG (SEQ ID NO: 666), QSGQG (SEQ ID NO: 667), SGQG (SEQ ID NO: 668), GQG (SEQ ID NO: 669) и G. В некоторых вариантах осуществления спейсер не присоединяют к N-концу ММ. В некоторых вариантах осуществления спейсер содержит, по меньшей мере, аминокислотную последовательность QGQSGQ (SEQ ID NO: 424). В некоторых вариантах осуществления спейсер содержит, по меньшей мере, аминокислотную последовательность QGQSGQG (SEQ ID NO: 645). В некоторых вариантах осуществления спейсер содержит, по меньшей мере, аминокислотную последовательность QGQSG (SEQ ID NO: 646). В некоторых вариантах осуществления спейсер содержит, по меньшей мере, аминокислотную последовательность QGQS (SEQ ID NO: 647). В некоторых вариантах осуществления спейсер содержит, по меньшей мере, аминокислотную последовательность QGQ (SEQ ID NO: 648). В некоторых вариантах осуществления спейсер содержит, по меньшей мере, аминокислотную последовательность QG (SEQ ID NO: 649). В некоторых вариантах осуществления спейсер содержит, по меньшей мере, аминокислотный остаток Q. В некоторых вариантах осуществления спейсер содержит, по меньшей мере, аминокислотную последовательность GQSGQG (SEQ ID NO: 666). В некоторых вариантах осуществления спейсер содержит, по меньшей мере, аминокислотную последовательность QSGQG (SEQ ID NO: 667). В некоторых вариантах осуществления спейсер содержит, по меньшей мере, аминокислотную последовательность SGQG (SEQ ID NO: 668). В некоторых вариантах осуществления спейсер содержит, по меньшей мере, аминокислотную последовательность GQG (SEQ ID NO: 669). В некоторых вариантах осуществления спейсер содержит, по меньшей мере, аминокислотную последовательность G. В некоторых вариантах осуществления спейсер отсутствует.

В некоторых вариантах осуществления АВ активируемого антитела естественным образом содержит одну или несколько дисульфидных связей. В некоторых вариантах осуществления АВ можно конструировать для включения одной или нескольких дисульфидных связей.

В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент является конъюгированным со средством. В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело содержит антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, проявляющие перекрестную конкуренцию с выделенным антителом, содержащим последовательность CDR1 VH GYTFTSYWMH (SEQ ID NO: 9); последовательность CDR2 VH AIYPGNSETG (SEQ ID NO: 10); последовательность CDR3 VH ENWDPGFAF (SEQ ID NO: 11); последовательность CDR1 VL SASSSVYYMY (SEQ ID NO: 12) или CRASSSVYYMY (SEQ ID NO: 13); последовательность CDR2 VL STSNLAS (SEQ ID NO: 14) и последовательность CDR3 VL QQRNYPYT (SEQ ID NO: 15). В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело содержит антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, проявляющие перекрестную конкуренцию с выделенным антителом, содержащим вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 3-5, и вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 6-8. В некоторых вариантах осуществления средство представляет собой ингибитор микротрубочек. В некоторых вариантах осуществления средство представляет собой повреждающее нуклеиновую кислоту средство. В некоторых вариантах осуществления средство выбрано из

группы, состоящей из доластатина или его производного, ауристинина или его производного, майтанзиноида или его производного, дуокармицина или его производного, калихеамицина или его производного, и пирролобензодиазепина или его производного. В некоторых вариантах осуществления средство представляет собой ауристинин Е или его производное. В некоторых вариантах осуществления средство представляет собой монометилауристинин Е (ММАЕ). В некоторых вариантах осуществления средство представляет собой монометилауристинин D (ММАД). В некоторых вариантах осуществления средство представляет собой майтанзиноид выбранный из группы, состоящей из DM1 и DM4. В некоторых вариантах осуществления средство представляет собой майтанзиноид DM4. В некоторых вариантах осуществления средство представляет собой дуокармицин. В некоторых вариантах осуществления средство является конъюгированным с АВ посредством линкера. В некоторых вариантах осуществления линкер, с помощью которого средство конъюгируют с АВ, содержит группу SPDB, группу vc, или группу PEG2-VC. В некоторых вариантах осуществления линкер и токсин, конъюгированные с АВ, содержат группу SPDB-DM4, группу vc-ММАД, группу vc-ММАЕ, vc-дуокармицин или группу PEG2-VC-ММАД. В некоторых вариантах осуществления линкер представляет собой расщепляемый линкер. В некоторых вариантах осуществления линкер представляет собой нерасщепляемый линкер. В некоторых вариантах осуществления средство представляет собой поддающуюся детекции группу. В некоторых вариантах осуществления поддающаяся детекции группа представляет собой диагностическое средство.

В некоторых вариантах осуществления конъюгированное активируемое антитело содержит конъюгированное активируемое антитело, которое в активированном состоянии связывает CD71, содержащее антитело или его антигенсвязывающий фрагмент (АВ), специфически связывающие CD71 млекопитающих, где АВ специфически связывает CD71 человека и CD71 яванского макака; маскирующую группу (ММ), ингибирующую связывание АВ с CD71, когда активируемое антитело находится в нерасщепленном состоянии; расщепляемую группу (СМ), присоединенную к АВ, где СМ представляет собой полипептид, функционирующий в качестве субстрата для протеазы; и средство, конъюгированное с АВ. В некоторых вариантах осуществления средство выбрано из группы, состоящей из доластатина или его производного, ауристинина или его производного, майтанзиноида или его производного, дуокармицина или его производного, калихеамицина или его производного и пирролобензодиазепина или его производного. В некоторых вариантах осуществления средство выбрано из группы, состоящей из ауристинина Е, монометилауристинина F (ММАF), монометилауристинина Е (ММАЕ), монометилауристинина D (ММАД), майтанзиноида DM4, майтанзиноида DM1, дуокармицина, пирролобензодиазепина и димера пирролобензодиазепина. В некоторых вариантах осуществления средство является конъюгированным с АВ посредством линкера. В некоторых вариантах осуществления линкер, с помощью которого средство конъюгируют с АВ, содержит группу SPDB, группу vc или группу PEG2-vc. В некоторых вариантах осуществления линкер и токсин, конъюгированные с АВ, содержат группу SPDB-DM4, группу vc-ММАД, группу vc-ММАЕ, vc-дуокармицин, или группу PEG2-vc-ММАД. В некоторых вариантах осуществления АВ из конъюгированного активируемого антитела или его антигенсвязывающего фрагмента содержит последовательность CDR1 VH GYTFTSYWMH (SEQ ID NO: 9); последовательность CDR2 VH AIYPGNSETG (SEQ ID NO: 10); последовательность CDR3 VH ENWDPGFAP (SEQ ID NO: 11); последовательность CDR1 VL SASSSVYYMY (SEQ ID NO: 12) или CRASSSVYYMY (SEQ ID NO: 13); последовательность CDR2 VL STSNLAS (SEQ ID NO: 14) и последовательность CDR3 VL QQRNYPYT (SEQ ID NO: 15). В некоторых вариантах осуществления АВ из конъюгированного активируемого антитела или его антигенсвязывающего фрагмента содержит вариabельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 3-5, и вариabельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 6-8 и 809-908. В некоторых вариантах осуществления ММ содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 16-295 и 297-314. В некоторых вариантах осуществления ММ содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 16, 17 и 297-314. В некоторых вариантах осуществления СМ содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 356-423, 680-698, 713, 714 и 789-808. В некоторых вариантах осуществления СМ содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 406-423, 680-698, 713, 714 и 807-808. В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело содержит комбинацию аминокислотных последовательностей, где комбинация аминокислотных последовательностей выбрана из одной строки в табл. D, где для данной комбинации, (a) тяжелая цепь АВ содержит аминокислотные последовательности из последовательностей CDR VH, соответствующих данной комбинации из перечисленных в одной строке табл. D, (b) легкая цепь АВ содержит аминокислотные последовательности из последовательностей CDR VL, соответствующих данной комбинации из перечисленных в одной строке табл. D, (c) ММ содержит аминокислотную последовательность из маскирующих последовательностей (ММ), соответствующих данной комбинации из перечисленных в одной строке табл. D, и (d) СМ содержит аминокислотную последовательность из субстратных последовательностей (СМ), соответствующих данной комбинации из перечисленных в одной строке табл. D. В некоторых вариантах осуществления, активируемое антитело содержит комбинацию аминокислотных последовательностей, где для данной комбинации ами-

нокислотных последовательностей (а) тяжелая цепь АВ содержит аминокислотные последовательности из последовательности VH или последовательностей CDR VH, выбранных из группы, состоящей из: последовательности VH или последовательностей CDR VH, перечисленных в соответствующем столбце табл. Е, (b) легкая цепь АВ содержит аминокислотные последовательности из последовательности VL или последовательностей CDR VL, выбранных из группы, состоящей из: последовательности VL или последовательностей CDR VL, перечисленных в соответствующем столбце табл. Е, (c) MM содержит аминокислотную последовательность из маскирующих последовательностей (MM), выбранных из группы, состоящей из последовательностей MM, перечисленных в соответствующем столбце таблицы Е, и (d) CM содержит аминокислотную последовательность из субстратных последовательностей (CM), выбранных из группы, состоящей из: последовательностей CM, перечисленных в соответствующем столбце табл. Е. В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 325 или 699; и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 327, 329, 331, 333, 335, 337, 650, 652, 654, 656, 658, 660, 670-673, 701-712, 721-788, 809-836 и 841-908.

В некоторых вариантах осуществления конъюгированное активируемое антитело содержит конъюгированное активируемое антитело, которое в активированном состоянии связывает CD71, содержащее антитело или его антигенсвязывающий фрагмент (AB), специфически связывающие CD71 млекопитающих, где АВ специфически связывает CD71 человека и CD71 яванского макака; маскирующую группу (MM), ингибирующую связывание АВ с CD71, когда активируемое антитело находится в нерасщепленном состоянии; расщепляемую группу (CM), присоединенную к АВ, где CM представляет собой полипептид, функционирующий в качестве субстрата для протеазы; и средство, конъюгированное с АВ, где АВ содержит: (i) последовательность CDR1 VH GYTFTSYWMH (SEQ ID NO: 9); последовательность CDR2 VH AIYPGNSETG (SEQ ID NO: 10); последовательность CDR3 VH ENWDPGFAF (SEQ ID NO: 11); последовательность CDR1 VL SASSSVYYMY (SEQ ID NO: 12) или CRASSSVYYMY (SEQ ID NO: 13); последовательность CDR2 VL STSNLAS (SEQ ID NO: 14) и последовательность CDR3 VL QQRN-YPYT (SEQ ID NO: 15) или (ii) вариabельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 3-5, и вариabельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 6-8, или (iii) тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 325 или 699, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 327, 329, 331, 333, 335, 337, 650, 652, 654, 656, 658, 660, 670-673, 701-712, 721-788, 809-836, и 841-908; и где средство выбрано из группы, состоящей из ауристатина Е, монометилауристатина F (MMAF), монометилауристатина Е (MMAE), монометилауристатина D (MMAD), майтанзиноида DM4, майтанзиноида DM1, пирролобензодиазефина, димера пирролобензодиазефина и дуокармицина. В некоторых вариантах осуществления MM содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 16-295 и 297-314. В некоторых вариантах осуществления MM содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 16, 17 и 297-314. В некоторых вариантах осуществления CM содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 356-423, 680-698, 713, 714 и 789-808. В некоторых вариантах осуществления CM содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 406-423, 680-698, 713, 714 и 807-808. В некоторых вариантах осуществления средство является конъюгированным с АВ посредством линкера и где линкер, с помощью которого средство конъюгируют с АВ, содержит группу SPDB, группу vc, или группу PEG2-VC. В некоторых вариантах осуществления линкер и токсин, конъюгированные с АВ, содержат группу SPDB-DM4, группу vc-MMAD, группу vc-MMAE, vc-дуокармицин или группу PEG2-vc-MMAD.

В некоторых вариантах осуществления конъюгированное активируемое антитело содержит конъюгированное активируемое антитело или конъюгированное антитело, содержащее антитело или его антигенсвязывающий фрагмент (AB), которые в активированном состоянии связывают CD71; и токсин, конъюгированный с АВ посредством линкера, где конъюгированное активируемое антитело или конъюгированное антитело содержит аминокислоту последовательности, линкер и токсин, выбранные из одной строки в табл. F, где для данной комбинации: (a) АВ содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность из последовательностей тяжелой цепи или последовательностей вариabельного домена тяжелой цепи, соответствующих данной комбинации из перечисленных в одной строке табл. F, (b) АВ содержит легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность из последовательностей легкой цепи или последовательностей вариabельного домена легкой цепи, соответствующих данной комбинации из перечисленных в одной строке табл. F, и (c) линкер и токсин содержат линкер и токсин, соответствующие данной комбинации из перечисленных в одной строке табл. F.

В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело кодировано последовательностью нуклеиновой кислоты, содержащей последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую аминокислотную последовательность вариabельной области тяжелой цепи, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1 и 3-5. В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело кодировано последовательностью нуклеиновой кислоты, содержащей последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую

нуклеиновой кислоты, содержащей последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую комбинацию из последовательности CDR1 VH, последовательности CDR2 VH, последовательности CDR3 VH, последовательности CDR1 VL, последовательности CDR2 VL и последовательности CDR3 VL, где комбинация представляет собой комбинацию из шести последовательностей CDR (CDR1 VH, CDR2 VH, CDR3 VH, CDR1 VL, CDR2 VL и CDR3 VL), показанных в одной строке в табл. 13.

В некоторых вариантах осуществления, активируемое антитело кодировано последовательностью нуклеиновой кислоты, содержащей последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую варируемую область легкой цепи, содержащую комбинацию последовательности CDR1 VL, последовательности CDR2 VL и последовательности CDR3 VL, где комбинация представляет собой комбинацию из трех последовательностей CDR легкой цепи (CDR1 VL, CDR2 VL, CDR3 VL), показанных в одной строке в табл. 13.

В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело кодировано последовательностью нуклеиновой кислоты, содержащей последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую варируемую область тяжелой цепи, содержащую комбинацию последовательности CDR1 VH, последовательности CDR2 VH и последовательности CDR3 VH, где комбинация представляет собой комбинацию из трех последовательностей CDR тяжелой цепи (CDR1 VH, CDR2 VH, CDR3 VH), показанных в одной строке в табл. 13.

В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело кодировано последовательностью нуклеиновой кислоты, содержащей последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую комбинацию последовательности CDR1 VH, последовательности CDR2 VH, последовательности CDR3 VH, последовательности CDR1 VL, последовательности CDR2 VL и последовательности CDR3 VL, где каждая последовательность CDR в комбинации содержит последовательность, по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичную соответствующей последовательности CDR в комбинации из шести последовательностей CDR (CDR1 VH, CDR2 VH, CDR3 VH, CDR1 VL, CDR2 VL и CDR3 VL), показанных в одной строке в табл. 13.

В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело кодировано последовательностью нуклеиновой кислоты, содержащей последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую варируемую область тяжелой цепи, содержащую комбинацию последовательности CDR1 VH, последовательности CDR2 VH и последовательности CDR3 VH, где каждая последовательность CDR в комбинации содержит последовательность, по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичную соответствующей последовательности CDR в комбинации из трех последовательностей CDR тяжелой цепи (CDR1 VH, CDR2 VH, CDR3 VH), показанных в одной строке в табл. 13.

В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело кодировано последовательностью нуклеиновой кислоты, содержащей последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую варируемую область легкой цепи, содержащую комбинацию последовательности CDR1 VL, последовательности CDR2 VL и последовательности CDR3 VL, где каждая последовательность CDR в комбинации содержит последовательность, по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичную соответствующей последовательности CDR в комбинации из трех последовательностей CDR легкой цепи (CDR1 VL, CDR2 VL, CDR3 VL), показанных в одной строке в табл. 13.

Описание относится также к способам получения активируемого антитела по этому описанию посредством культивирования клеток в условиях, обеспечивающих экспрессию активируемого антитела, где клетка содержит молекулу нуклеиновой кислоты по этому описанию или вектор по этому описанию.

Описание относится также к способам изготовления активируемого антитела, которое, в активированном состоянии, связывает CD71, где способ включает в себя: (а) культивирование клетки, содержащей конструкцию нуклеиновой кислоты, кодирующую активируемое антитело, в условиях, обеспечивающих экспрессию активируемого антитела, где активируемое антитело содержит активируемое антитело по этому описанию; и (b) выделение активируемого антитела.

В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело содержит один или несколько полипептидов, содержащих комбинацию последовательностей в данной строке табл. D или любую комбинацию маскирующей последовательности (MM), субстратной последовательности (CM), последовательности варируемого домена легкой цепи или последовательностей CDR варируемого домена легкой цепи и последовательности варируемого домена тяжелой цепи или последовательностей CDR варируемого домена тяжелой цепи из табл. E.

Таблица D. Комбинации активируемых антител против CD71

№ комбинации	Маскирующая последовательность (MM)	Субстратная последовательность (CM)	CDR VL, SEQ ID NO	CDR VH, SEQ ID NO
1	QFCPWSYYLIGDCDI (SEQ ID NO: 16)	LSGRSDNH (SEQ ID NO: 359)	12, 14, 15	9, 10, 11
2	QFCPWSYYLIGDCDI (SEQ ID NO: 16)	ISSGLLSS (SEQ ID NO: 382)	12, 14, 15	9, 10, 11
3	QFCPWSYYLIGDCDI (SEQ ID NO: 16)	LSGRSGNH (SEQ ID NO: 789)	12, 14, 15	9, 10, 11
4	QFCPWSYYLIGDCDI (SEQ ID NO: 16)	AVGLLAPP (SEQ ID NO: 390)	12, 14, 15	9, 10, 11
5	QFCPWSYYLIGDCDI (SEQ ID NO: 16)	VHMLPLGLGP (SEQ ID NO: 370)	12, 14, 15	9, 10, 11
6	QFCPWSYYLIGDCDI (SEQ ID NO: 16)	TSTSGRSANPRG (SEQ ID NO: 397)	12, 14, 15	9, 10, 11
7	QFCPWSYYLIGDCDI (SEQ ID NO: 16)	QNQALRMA (SEQ ID NO: 377)	12, 14, 15	9, 10, 11
8	QFCPWSYYLIGDCDI (SEQ ID NO: 16)	ISSGLLSGRSDNH (SEQ ID NO: 406)	12, 14, 15	9, 10, 11
9	QFCPWSYYLIGDCDI (SEQ ID NO: 16)	ISSGLLSGRSGNH (SEQ ID NO: 423)	12, 14, 15	9, 10, 11
10	QFCPWSYYLIGDCDI (SEQ ID NO: 16)	ISSGLLSGRSANPRG (SEQ ID NO: 680)	12, 14, 15	9, 10, 11
11	QFCPWSYYLIGDCDI (SEQ ID NO: 16)	AVGLLAPPTSGRSANPRG (SEQ ID NO: 681)	12, 14, 15	9, 10, 11
12	QFCPWSYYLIGDCDI (SEQ ID NO: 16)	AVGLLAPPSGRSANPRG (SEQ ID NO: 682)	12, 14, 15	9, 10, 11
13	QFCPWSYYLIGDCDI (SEQ ID NO: 16)	ISSGLLSGRSDDH (SEQ ID NO: 683)	12, 14, 15	9, 10, 11
14	QFCPWSYYLIGDCDI (SEQ ID NO: 16)	ISSGLLSGRSDIH (SEQ ID NO: 684)	12, 14, 15	9, 10, 11
15	QFCPWSYYLIGDCDI (SEQ ID NO: 16)	ISSGLLSGRSDQH (SEQ ID NO: 685)	12, 14, 15	9, 10, 11
16	QFCPWSYYLIGDCDI (SEQ ID NO: 16)	ISSGLLSGRSDTH (SEQ ID NO: 686)	12, 14, 15	9, 10, 11
17	QFCPWSYYLIGDCDI (SEQ ID NO: 16)	ISSGLLSGRSDYH (SEQ ID NO: 687)	12, 14, 15	9, 10, 11
18	QFCPWSYYLIGDCDI (SEQ ID NO: 16)	ISSGLLSGRSDNP (SEQ ID NO: 688)	12, 14, 15	9, 10, 11
19	QFCPWSYYLIGDCDI (SEQ ID NO: 16)	ISSGLLSGRSANP (SEQ ID NO: 689)	12, 14, 15	9, 10, 11
20	QFCPWSYYLIGDCDI (SEQ ID NO: 16)	ISSGLLSGRSANI (SEQ ID NO: 690)	12, 14, 15	9, 10, 11
21	QFCPWSYYLIGDCDI (SEQ ID NO: 16)	ISSGLLSGRSDNI (SEQ ID NO: 713)	12, 14, 15	9, 10, 11
22	QFCPWSYYLIGDCDI (SEQ ID NO: 16)	AVGLLAPPGLSGRSDNH (SEQ ID NO: 412)	12, 14, 15	9, 10, 11
23	QFCPWSYYLIGDCDI (SEQ ID NO: 16)	AVGLLAPPGLSGRSDDH (SEQ ID NO: 691)	12, 14, 15	9, 10, 11
24	QFCPWSYYLIGDCDI (SEQ ID NO: 16)	AVGLLAPPGLSGRSDIH (SEQ ID NO: 692)	12, 14, 15	9, 10, 11
25	QFCPWSYYLIGDCDI (SEQ ID NO: 16)	AVGLLAPPGLSGRSDQH (SEQ ID NO: 693)	12, 14, 15	9, 10, 11
26	QFCPWSYYLIGDCDI (SEQ ID NO: 16)	AVGLLAPPGLSGRSDTH (SEQ ID NO: 694)	12, 14, 15	9, 10, 11
27	QFCPWSYYLIGDCDI (SEQ ID NO: 16)	AVGLLAPPGLSGRSDYH (SEQ ID NO: 695)	12, 14, 15	9, 10, 11
28	QFCPWSYYLIGDCDI (SEQ ID NO: 16)	AVGLLAPPGLSGRSDNP (SEQ ID NO: 696)	12, 14, 15	9, 10, 11
29	QFCPWSYYLIGDCDI (SEQ ID NO: 16)	AVGLLAPPGLSGRSANP (SEQ ID NO: 697)	12, 14, 15	9, 10, 11
30	QFCPWSYYLIGDCDI (SEQ ID NO: 16)	AVGLLAPPGLSGRSANI (SEQ ID NO: 698)	12, 14, 15	9, 10, 11
31	QFCPWSYYLIGDCDI (SEQ ID NO: 16)	AVGLLAPPGLSGRSDNI (SEQ ID NO: 714)	12, 14, 15	9, 10, 11
32	QFCPWSYYLIGDCDI (SEQ ID NO: 16)	ISSGLLSGGSGLSGRSDNH (SEQ ID NO: 407)	12, 14, 15	9, 10, 11
33	NLCTEHSFALDCRSY (SEQ ID NO: 17)	LSGRSDNH (SEQ ID NO: 359)	12, 14, 15	9, 10, 11
34	NLCTEHSFALDCRSY (SEQ ID NO: 17)	ISSGLLSS (SEQ ID NO: 382)	12, 14, 15	9, 10, 11
35	NLCTEHSFALDCRSY (SEQ ID NO: 17)	LSGRSGNH (SEQ ID NO: 789)	12, 14, 15	9, 10, 11
36	NLCTEHSFALDCRSY (SEQ ID NO: 17)	AVGLLAPP (SEQ ID NO: 390)	12, 14, 15	9, 10, 11
37	NLCTEHSFALDCRSY (SEQ ID NO: 17)	VHMLPLGLGP (SEQ ID NO: 370)	12, 14, 15	9, 10, 11
38	NLCTEHSFALDCRSY (SEQ ID NO: 17)	TSTSGRSANPRG (SEQ ID NO: 397)	12, 14, 15	9, 10, 11
39	NLCTEHSFALDCRSY (SEQ ID NO: 17)	QNQALRMA (SEQ ID NO: 377)	12, 14, 15	9, 10, 11
40	NLCTEHSFALDCRSY (SEQ ID NO: 17)	ISSGLLSGRSDNH (SEQ ID NO: 406)	12, 14, 15	9, 10, 11
41	NLCTEHSFALDCRSY (SEQ ID NO: 17)	ISSGLLSGRSGNH (SEQ ID NO: 423)	12, 14, 15	9, 10, 11
42	NLCTEHSFALDCRSY (SEQ ID NO: 17)	ISSGLLSGRSANPRG (SEQ ID NO: 680)	12, 14, 15	9, 10, 11
43	NLCTEHSFALDCRSY (SEQ ID NO: 17)	AVGLLAPPTSGRSANPRG (SEQ ID NO: 681)	12, 14, 15	9, 10, 11
44	NLCTEHSFALDCRSY (SEQ ID NO: 17)	AVGLLAPPSGRSANPRG (SEQ ID NO: 682)	12, 14, 15	9, 10, 11
45	NLCTEHSFALDCRSY (SEQ ID NO: 17)	ISSGLLSGRSDDH (SEQ ID NO: 683)	12, 14, 15	9, 10, 11
46	NLCTEHSFALDCRSY (SEQ ID NO: 17)	ISSGLLSGRSDIH (SEQ ID NO: 684)	12, 14, 15	9, 10, 11

47	NLCTEHSFALDCRSY (SEQ ID NO: 17)	ISSGLLSGRSDQH (SEQ ID NO: 685)	12, 14, 15	9, 10, 11
48	NLCTEHSFALDCRSY (SEQ ID NO: 17)	ISSGLLSGRSDTH (SEQ ID NO: 686)	12, 14, 15	9, 10, 11
49	NLCTEHSFALDCRSY (SEQ ID NO: 17)	ISSGLLSGRSDYH (SEQ ID NO: 687)	12, 14, 15	9, 10, 11
50	NLCTEHSFALDCRSY (SEQ ID NO: 17)	ISSGLLSGRSDNP (SEQ ID NO: 688)	12, 14, 15	9, 10, 11
51	NLCTEHSFALDCRSY (SEQ ID NO: 17)	ISSGLLSGRSANP (SEQ ID NO: 689)	12, 14, 15	9, 10, 11
52	NLCTEHSFALDCRSY (SEQ ID NO: 17)	ISSGLLSGRSANI (SEQ ID NO: 690)	12, 14, 15	9, 10, 11
53	NLCTEHSFALDCRSY (SEQ ID NO: 17)	ISSGLLSGRSDNI (SEQ ID NO: 713)	12, 14, 15	9, 10, 11
54	NLCTEHSFALDCRSY (SEQ ID NO: 17)	AVGLLAPPGGLSGRSDNH (SEQ ID NO: 412)	12, 14, 15	9, 10, 11
55	NLCTEHSFALDCRSY (SEQ ID NO: 17)	AVGLLAPPGGLSGRSDDH (SEQ ID NO: 691)	12, 14, 15	9, 10, 11
56	NLCTEHSFALDCRSY (SEQ ID NO: 17)	AVGLLAPPGGLSGRSDIH (SEQ ID NO: 692)	12, 14, 15	9, 10, 11
57	NLCTEHSFALDCRSY (SEQ ID NO: 17)	AVGLLAPPGGLSGRSDQH (SEQ ID NO: 693)	12, 14, 15	9, 10, 11
58	NLCTEHSFALDCRSY (SEQ ID NO: 17)	AVGLLAPPGGLSGRSDTH (SEQ ID NO: 694)	12, 14, 15	9, 10, 11
59	NLCTEHSFALDCRSY (SEQ ID NO: 17)	AVGLLAPPGGLSGRSDYH (SEQ ID NO: 695)	12, 14, 15	9, 10, 11
60	NLCTEHSFALDCRSY (SEQ ID NO: 17)	AVGLLAPPGGLSGRSDNP (SEQ ID NO: 696)	12, 14, 15	9, 10, 11
61	NLCTEHSFALDCRSY (SEQ ID NO: 17)	AVGLLAPPGGLSGRSANP (SEQ ID NO: 697)	12, 14, 15	9, 10, 11
62	NLCTEHSFALDCRSY (SEQ ID NO: 17)	AVGLLAPPGGLSGRSANI (SEQ ID NO: 698)	12, 14, 15	9, 10, 11
63	NLCTEHSFALDCRSY (SEQ ID NO: 17)	AVGLLAPPGGLSGRSDNI (SEQ ID NO: 714)	12, 14, 15	9, 10, 11
64	NLCTEHSFALDCRSY (SEQ ID NO: 17)	ISSGLLSGGSGGLSGRSDNH (SEQ ID NO: 407)	12, 14, 15	9, 10, 11
65	NLCTEHSFALDCRSY (SEQ ID NO: 309)	LSGRSDNH (SEQ ID NO: 359)	12, 14, 15	9, 10, 11
66	NLCTEHSFALDCRSY (SEQ ID NO: 309)	ISSGLLS (SEQ ID NO: 382)	12, 14, 15	9, 10, 11
67	NLCTEHSFALDCRSY (SEQ ID NO: 309)	LSGRSGNH (SEQ ID NO: 789)	12, 14, 15	9, 10, 11
68	NLCTEHSFALDCRSY (SEQ ID NO: 309)	AVGLLAPP (SEQ ID NO: 390)	12, 14, 15	9, 10, 11
69	NLCTEHSFALDCRSY (SEQ ID NO: 309)	VHMPGLFLGP (SEQ ID NO: 370)	12, 14, 15	9, 10, 11
70	NLCTEHSFALDCRSY (SEQ ID NO: 309)	TSTSGRSANPRG (SEQ ID NO: 397)	12, 14, 15	9, 10, 11
71	NLCTEHSFALDCRSY (SEQ ID NO: 309)	QNQALRMA (SEQ ID NO: 377)	12, 14, 15	9, 10, 11
72	NLCTEHSFALDCRSY (SEQ ID NO: 309)	ISSGLLSGRSDNH (SEQ ID NO: 406)	12, 14, 15	9, 10, 11
73	NLCTEHSFALDCRSY (SEQ ID NO: 309)	ISSGLLSGRSGNH (SEQ ID NO: 423)	12, 14, 15	9, 10, 11
74	NLCTEHSFALDCRSY (SEQ ID NO: 309)	ISSGLLSGRSANPRG (SEQ ID NO: 680)	12, 14, 15	9, 10, 11
75	NLCTEHSFALDCRSY (SEQ ID NO: 309)	AVGLLAPPTSGRSANPRG (SEQ ID NO: 681)	12, 14, 15	9, 10, 11
76	NLCTEHSFALDCRSY (SEQ ID NO: 309)	AVGLLAPPGSGRSANPRG (SEQ ID NO: 682)	12, 14, 15	9, 10, 11
77	NLCTEHSFALDCRSY (SEQ ID NO: 309)	ISSGLLSGRSDDH (SEQ ID NO: 683)	12, 14, 15	9, 10, 11
78	NLCTEHSFALDCRSY (SEQ ID NO: 309)	ISSGLLSGRSDIH (SEQ ID NO: 684)	12, 14, 15	9, 10, 11
79	NLCTEHSFALDCRSY (SEQ ID NO: 309)	ISSGLLSGRSDQH (SEQ ID NO: 685)	12, 14, 15	9, 10, 11
80	NLCTEHSFALDCRSY (SEQ ID NO: 309)	ISSGLLSGRSDTH (SEQ ID NO: 686)	12, 14, 15	9, 10, 11
81	NLCTEHSFALDCRSY (SEQ ID NO: 309)	ISSGLLSGRSDYH (SEQ ID NO: 687)	12, 14, 15	9, 10, 11
82	NLCTEHSFALDCRSY (SEQ ID NO: 309)	ISSGLLSGRSDNP (SEQ ID NO: 688)	12, 14, 15	9, 10, 11
83	NLCTEHSFALDCRSY (SEQ ID NO: 309)	ISSGLLSGRSANP (SEQ ID NO: 689)	12, 14, 15	9, 10, 11
84	NLCTEHSFALDCRSY (SEQ ID NO: 309)	ISSGLLSGRSANI (SEQ ID NO: 690)	12, 14, 15	9, 10, 11
85	NLCTEHSFALDCRSY (SEQ ID NO: 309)	ISSGLLSGRSDNI (SEQ ID NO: 713)	12, 14, 15	9, 10, 11
86	NLCTEHSFALDCRSY (SEQ ID NO: 309)	AVGLLAPPGGLSGRSDNH (SEQ ID NO: 412)	12, 14, 15	9, 10, 11
87	NLCTEHSFALDCRSY (SEQ ID NO: 309)	AVGLLAPPGGLSGRSDDH (SEQ ID NO: 691)	12, 14, 15	9, 10, 11
88	NLCTEHSFALDCRSY (SEQ ID NO: 309)	AVGLLAPPGGLSGRSDIH (SEQ ID NO: 692)	12, 14, 15	9, 10, 11
89	NLCTEHSFALDCRSY (SEQ ID NO: 309)	AVGLLAPPGGLSGRSDQH (SEQ ID NO: 693)	12, 14, 15	9, 10, 11
90	NLCTEHSFALDCRSY (SEQ ID NO: 309)	AVGLLAPPGGLSGRSDTH (SEQ ID NO: 694)	12, 14, 15	9, 10, 11
91	NLCTEHSFALDCRSY (SEQ ID NO: 309)	AVGLLAPPGGLSGRSDYH (SEQ ID NO: 695)	12, 14, 15	9, 10, 11
92	NLCTEHSFALDCRSY (SEQ ID NO: 309)	AVGLLAPPGGLSGRSDNP (SEQ ID NO: 696)	12, 14, 15	9, 10, 11
93	NLCTEHSFALDCRSY (SEQ ID NO: 309)	AVGLLAPPGGLSGRSANP (SEQ ID NO: 697)	12, 14, 15	9, 10, 11
94	NLCTEHSFALDCRSY (SEQ ID NO: 309)	AVGLLAPPGGLSGRSANI (SEQ ID NO: 698)	12, 14, 15	9, 10, 11
95	NLCTEHSFALDCRSY (SEQ ID NO: 309)	AVGLLAPPGGLSGRSDNI (SEQ ID NO: 714)	12, 14, 15	9, 10, 11
96	NLCTEHSFALDCRSY (SEQ ID NO: 309)	ISSGLLSGGSGGLSGRSDNH (SEQ ID NO: 407)	12, 14, 15	9, 10, 11

97	CTEHSFALDC (SEQ ID NO: 314)	LSGRSDNH (SEQ ID NO: 359)	12, 14, 15	9, 10, 11
98	CTEHSFALDC (SEQ ID NO: 314)	ISSGLLS (SEQ ID NO: 382)	12, 14, 15	9, 10, 11
99	CTEHSFALDC (SEQ ID NO: 314)	LSGRSGNH (SEQ ID NO: 789)	12, 14, 15	9, 10, 11
100	CTEHSFALDC (SEQ ID NO: 314)	AVGLLAPP (SEQ ID NO: 390)	12, 14, 15	9, 10, 11
101	CTEHSFALDC (SEQ ID NO: 314)	VHMPGLGPG (SEQ ID NO: 370)	12, 14, 15	9, 10, 11
102	CTEHSFALDC (SEQ ID NO: 314)	TSTSGRSANPRG (SEQ ID NO: 397)	12, 14, 15	9, 10, 11
103	CTEHSFALDC (SEQ ID NO: 314)	QNQALRMA (SEQ ID NO: 377)	12, 14, 15	9, 10, 11
104	CTEHSFALDC (SEQ ID NO: 314)	ISSGLLSGRSDNH (SEQ ID NO: 406)	12, 14, 15	9, 10, 11
105	CTEHSFALDC (SEQ ID NO: 314)	ISSGLLSGRSGNH (SEQ ID NO: 423)	12, 14, 15	9, 10, 11
106	CTEHSFALDC (SEQ ID NO: 314)	ISSGLLSGRSANPRG (SEQ ID NO: 680)	12, 14, 15	9, 10, 11
107	CTEHSFALDC (SEQ ID NO: 314)	AVGLLAPPTSGRSANPRG (SEQ ID NO: 681)	12, 14, 15	9, 10, 11
108	CTEHSFALDC (SEQ ID NO: 314)	AVGLLAPPSGRSANPRG (SEQ ID NO: 682)	12, 14, 15	9, 10, 11
109	CTEHSFALDC (SEQ ID NO: 314)	ISSGLLSGRSDDH (SEQ ID NO: 683)	12, 14, 15	9, 10, 11
110	CTEHSFALDC (SEQ ID NO: 314)	ISSGLLSGRSDIH (SEQ ID NO: 684)	12, 14, 15	9, 10, 11
111	CTEHSFALDC (SEQ ID NO: 314)	ISSGLLSGRSDQH (SEQ ID NO: 685)	12, 14, 15	9, 10, 11
112	CTEHSFALDC (SEQ ID NO: 314)	ISSGLLSGRSDTH (SEQ ID NO: 686)	12, 14, 15	9, 10, 11
113	CTEHSFALDC (SEQ ID NO: 314)	ISSGLLSGRSDYH (SEQ ID NO: 687)	12, 14, 15	9, 10, 11
114	CTEHSFALDC (SEQ ID NO: 314)	ISSGLLSGRSDNP (SEQ ID NO: 688)	12, 14, 15	9, 10, 11
115	CTEHSFALDC (SEQ ID NO: 314)	ISSGLLSGRSAMP (SEQ ID NO: 689)	12, 14, 15	9, 10, 11
116	CTEHSFALDC (SEQ ID NO: 314)	ISSGLLSGRSANI (SEQ ID NO: 690)	12, 14, 15	9, 10, 11
117	CTEHSFALDC (SEQ ID NO: 314)	ISSGLLSGRSDNI (SEQ ID NO: 713)	12, 14, 15	9, 10, 11
118	CTEHSFALDC (SEQ ID NO: 314)	AVGLLAPPGLSGRSDNH (SEQ ID NO: 412)	12, 14, 15	9, 10, 11
119	CTEHSFALDC (SEQ ID NO: 314)	AVGLLAPPGLSGRSDDH (SEQ ID NO: 691)	12, 14, 15	9, 10, 11
120	CTEHSFALDC (SEQ ID NO: 314)	AVGLLAPPGLSGRSDIH (SEQ ID NO: 692)	12, 14, 15	9, 10, 11
121	CTEHSFALDC (SEQ ID NO: 314)	AVGLLAPPGLSGRSDQH (SEQ ID NO: 693)	12, 14, 15	9, 10, 11
122	CTEHSFALDC (SEQ ID NO: 314)	AVGLLAPPGLSGRSDTH (SEQ ID NO: 694)	12, 14, 15	9, 10, 11
123	CTEHSFALDC (SEQ ID NO: 314)	AVGLLAPPGLSGRSDYH (SEQ ID NO: 695)	12, 14, 15	9, 10, 11
124	CTEHSFALDC (SEQ ID NO: 314)	AVGLLAPPGLSGRSDNP (SEQ ID NO: 696)	12, 14, 15	9, 10, 11
125	CTEHSFALDC (SEQ ID NO: 314)	AVGLLAPPGLSGRSAMP (SEQ ID NO: 697)	12, 14, 15	9, 10, 11
126	CTEHSFALDC (SEQ ID NO: 314)	AVGLLAPPGLSGRSANI (SEQ ID NO: 698)	12, 14, 15	9, 10, 11
127	CTEHSFALDC (SEQ ID NO: 314)	AVGLLAPPGLSGRSDNI (SEQ ID NO: 714)	12, 14, 15	9, 10, 11
128	CTEHSFALDC (SEQ ID NO: 314)	ISSGLLSGGSGLSGRSDNH (SEQ ID NO: 407)	12, 14, 15	9, 10, 11

Таблица Е. Компоненты активируемых антител против CD71

Маскирующая последовательность (MM)	Субстратная последовательность (CM)	VL или CDR VL	VH или CDR VH
QFCPWSYLLIGDCDI (SEQ ID NO: 16)	LSGRSDNH (SEQ ID NO: 359)	SEQ ID NO: 12, 14, 15	SEQ ID NO: 9, 10, 11
QFCAWSYLLIGDCDI (SEQ ID NO: 297)	TGRGPSWV (SEQ ID NO: 356)	SEQ ID NO: 6	SEQ ID NO: 3
QFCPASYYLIGDCDI (SEQ ID NO: 298)	PLTGRSGG (SEQ ID NO: 362)	SEQ ID NO: 7	SEQ ID NO: 4
QFCPWAYYLLIGDCDI (SEQ ID NO: 299)	TARGPSFK (SEQ ID NO: 358)	SEQ ID NO: 8	SEQ ID NO: 5
QFCPWSAYLLIGDCDI (SEQ ID NO: 300)	NLSGRSENHSG (SEQ ID NO: 395)	SEQ ID NO: 13, 14, 15	
QFCPWSYALIGDCDI (SEQ ID NO: 301)	NLSGRSGNHGS (SEQ ID NO: 396)		
QFCPWSYYAIGDCDI (SEQ ID NO: 302)	TSTSGRSANPRG (SEQ ID NO: 397)		
QFCPWSYLLAGDCDI (SEQ ID NO: 303)	TSGRSANP (SEQ ID NO: 398)		
QFCPWSYLLIGACDI (SEQ ID NO: 304)	VHMPGLFLGP (SEQ ID NO: 370)		
NLCTEHSFALDCRSY (SEQ ID NO: 17)	AVGLLAPP (SEQ ID NO: 390)		
NLCAEHSFALDCRSY (SEQ ID NO: 305)	AQNLLGMV (SEQ ID NO: 378)		
NLCTAHSFALDCRSY (SEQ ID NO: 306)	QNQALRMA (SEQ ID NO: 377)		
NLCTEASFALDCRSY (SEQ ID NO: 307)	LAAPLGLL (SEQ ID NO: 389)		
NLCTEHAFALDCRSY (SEQ ID NO: 308)	STFFPGMF (SEQ ID NO: 379)		
NLCTEHSALDCRSY (SEQ ID NO: 309)	ISSGLLS (SEQ ID NO: 382)		
NLCTEHSFAADCRSY (SEQ ID NO: 310)	PAGLWLDP (SEQ ID NO: 392)		
NLCTEHSFALACRSY (SEQ ID NO: 311)	VAGRSMRP (SEQ ID NO: 399)		
NLCTEHSFALDCASY (SEQ ID NO: 312)	VVPEGRRS (SEQ ID NO: 400)		
CTEHSFALDCRSY (SEQ ID NO: 313)	ILPRSPAF (SEQ ID NO: 401)		
CTEHSFALDC (SEQ ID NO: 314)	MVLGRSLL (SEQ ID NO: 402)		
	QGRAITFI (SEQ ID NO: 403)		
	SPRSIMLA (SEQ ID NO: 404)		
	SMLRSMP (SEQ ID NO: 405)		
	ISSGLLSGRSDNH (SEQ ID NO: 406)		
	AVGLLAPPGLSGRSDNH (SEQ ID NO: 412)		
	ISSGLLSGGSGLSGRSDNH (SEQ ID NO: 407)		
	LSGRSGNH (SEQ ID NO: 789)		
	SGRSANPRG (SEQ ID NO: 790)		
	LSGRSDDH (SEQ ID NO: 791)		
	LSGRSDIH (SEQ ID NO: 792)		
	LSGRSDQH (SEQ ID NO: 793)		
	LSGRSDTH (SEQ ID NO: 794)		
	LSGRSDYH (SEQ ID NO: 795)		
	LSGRSDNP (SEQ ID NO: 796)		
	LSGRSANP (SEQ ID NO: 797)		
	LSGRSANI (SEQ ID NO: 798)		
	LSGRSDNI (SEQ ID NO: 799)		
	MIAPVAYR (SEQ ID NO: 800)		
	RFSEPMWAY (SEQ ID NO: 801)		
	WATPRPMR (SEQ ID NO: 802)		
	FRLLDWQW (SEQ ID NO: 803)		
	ISSGL (SEQ ID NO: 804)		
	ISSGLS (SEQ ID NO: 805)		
	ISSGLL (SEQ ID NO: 806)		
	ISSGLLSGRSANPRG (SEQ ID NO: 680)		
	AVGLLAPPTSGRSANPRG (SEQ ID NO: 681)		
	AVGLLAPPSGRSANPRG (SEQ ID NO: 682)		
	ISSGLLSGRSDDH (SEQ ID NO: 683)		
	ISSGLLSGRSDIH (SEQ ID NO: 684)		
	ISSGLLSGRSDQH (SEQ ID NO: 685)		
	ISSGLLSGRSDTH (SEQ ID NO: 686)		
	ISSGLLSGRSDYH (SEQ ID NO: 687)		
	ISSGLLSGRSDNP (SEQ ID NO: 688)		
	ISSGLLSGRSANP (SEQ ID NO: 689)		
	ISSGLLSGRSANI (SEQ ID NO: 690)		

	AVGLLAPPGGLSGRSDDH (SEQ ID NO: 691)		
	AVGLLAPPGGLSGRSDIH (SEQ ID NO: 692)		
	AVGLLAPPGGLSGRSDQH (SEQ ID NO: 693)		
	AVGLLAPPGGLSGRSDTH (SEQ ID NO: 694)		
	AVGLLAPPGGLSGRSDYH (SEQ ID NO: 695)		
	AVGLLAPPGGLSGRSDNP (SEQ ID NO: 696)		
	AVGLLAPPGGLSGRSANP (SEQ ID NO: 697)		
	AVGLLAPPGGLSGRSANI (SEQ ID NO: 698)		
	ISSGLSGRSDNI (SEQ ID NO: 713)		
	AVGLLAPPGGLSGRSDNI (SEQ ID NO: 714)		
	GLSGRSDNHGGAVGLLAPP (SEQ ID NO: 807)		
	GLSGRSDNHGGVHMPGLGFLGP (SEQ ID NO: 808)		

В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело по настоящему описанию содержит один или несколько полипептидов, содержащих комбинацию последовательностей, выбранных из табл. D или E, где полипептид содержит комбинацию маскирующей последовательности, выбранной из столбца, озаглавленного "Маскирующая последовательность (MM)", из табл. D или E, субстратной последовательности из столбца, озаглавленного "Субстратная последовательность (CM)", из табл. D или E, варибельного домена легкой цепи или CDR легкой цепи из столбца, озаглавленного "VL или CDR VL" или "CDR VL, SEQ ID NO", из табл. D или E, и варибельного домена тяжелой цепи или CDR тяжелой цепи из столбца, озаглавленного "VH или CDR VH" или "CDR VH, SEQ ID NO", из табл. D или E. Например, активируемое антитело по настоящему описанию может содержать аминокислотные последовательности из комбинации по. 54, включающие в себя маскирующую последовательность из SEQ ID NO: 17, субстратную последовательность из SEQ ID NO: 412, варибельный домен легкой цепи, включающий в себя последовательности CDR VL из SEQ ID NO: 12, 14 и 15, и варибельный домен тяжелой цепи, включающий в себя последовательности CDR VH из 9, 10 и 11. Таким образом, активируемое антитело, содержащее, по меньшей мере, комбинацию последовательностей в любой данной строке табл. D, описано в настоящем документе. Подобным образом, любая комбинация маскирующей последовательности (MM), субстратной последовательности (CM), последовательности варибельного домена легкой цепи или последовательностей CDR варибельного домена легкой цепи и последовательности варибельного домена тяжелой цепи или последовательностей CDR варибельного домена тяжелой цепи из табл. E, описано в настоящем документе. Активируемое антитело, содержащее, по меньшей мере, любую комбинацию маскирующей последовательности, субстратной последовательности, варибельной области тяжелой цепи или CDR варибельной области тяжелой цепи, и варибельной области легкой цепи или CDR варибельной области легкой цепи, выбранных из соответствующих столбцов табл. D или E, также описано в настоящем документе. В некоторых иллюстративных вариантах осуществления активируемое антитело, содержащее по меньшей мере комбинацию последовательностей в любой данной строке табл. D или любую комбинацию из маскирующей последовательности (MM), субстратной последовательности (CM), последовательности варибельного домена легкой цепи или последовательностей CDR варибельного домена легкой цепи и последовательности варибельного домена тяжелой цепи или последовательностей CDR варибельного домена тяжелой цепи из табл. E, можно комбинировать с одним или несколькими токсинами, включая доластатин или его производное, ауристин или его производное, майтанзиноид или его производное, дуокармицин или его производное, калихеамицин или его производное, или пирролобензодиазепин или его производное. В некоторых иллюстративных вариантах осуществления активируемое антитело, содержащее, по меньшей мере, комбинацию последовательностей в любой данной строке табл. D или любую комбинацию маскирующей последовательности (MM), субстратной последовательности (CM), последовательности варибельного домена легкой цепи или последовательностей CDR варибельного домена легкой цепи, и последовательности варибельного домена тяжелой цепи или последовательностей CDR варибельного домена тяжелой цепи из табл. E, можно комбинировать с одним или несколькими токсинами, включая ауристин E, монометиладельтаин F (MMAF), монометиладельтаин E (MMAE), монометиладельтаин D (MMAD), майтанзиноид DM4, майтанзиноид DM1, пирролобензодиазепин, димер пирролобензодиазепина и/или дуокармицин.

Любые из комбинаций в табл. D или E, как описано выше, можно комбинировать с константными областями иммуноглобулина человека для получения полностью человеческих IgG, включая IgG1, IgG2, IgG4, или с мутантными константными областями для получения IgG человека с измененными функциями, такими как IgG1 N297A, IgG1 N297Q или IgG4 S228P. Комбинации, описанные в табл. D или E, не являются ограниченными конкретными комбинациями, показанными в любой данной строке, и таким образом, могут включать в себя любую маскирующую последовательность из столбца 2 из табл. D (или столбца 1 из табл. E), комбинированную с любой субстратной последовательностью из столбца 3 из табл. D (или столбца 2 из табл. E), комбинированную с любой последовательностью VL или набором последовательностей CDR VL из столбца 4 из табл. D (или столбца 3 из табл. E), комбинированную с любой по-

следовательностью VH или набором последовательностей CDR VH из столбца 5 из табл. D (или столбца 4 из табл. E). В дополнение к маскирующим последовательностям, описанным в столбце 2 из табл. D или столбце 1 из табл. E, любую маскирующую последовательность, описанную в настоящем документе, можно использовать в комбинации. В дополнение к субстратным последовательностям, описанным в столбце 3 из табл. D или столбце 2 из табл. E, любую CM, описанную в настоящем документе, можно использовать в комбинации. В дополнение к последовательности вариабельной области легкой цепи или последовательностям CDR легкой цепи, описанным в столбце 4 из табл. D или столбце 3 из табл. E, любую последовательность вариабельной области легкой цепи или последовательности CDR легкой цепи, описанные в настоящем документе, можно использовать в комбинации. В дополнение к последовательности вариабельной области тяжелой цепи или последовательностям CDR тяжелой цепи, описанным в столбце 5 из табл. D или столбце 4 из табл. E, любую последовательность вариабельной области тяжелой цепи или последовательности CDR тяжелой цепи, описанные в настоящем документе, можно использовать в комбинации.

В некоторых вариантах осуществления конъюгаты антитела с лекарственным средством (ADC) и конъюгаты активируемого антитела с лекарственным средством (AADC) могут содержать один или несколько полипептидов, включающих комбинацию последовательности легкой цепи или последовательности вариабельного домена легкой цепи, и последовательности тяжелой цепи или последовательности вариабельного домена тяжелой цепи, линкера и токсина в данной строке из табл. F или любую комбинацию последовательности легкой цепи или последовательности вариабельного домена легкой цепи и последовательности тяжелой цепи или последовательности вариабельного домена тяжелой цепи, линкера и токсина из табл. F.

Таблица F. Комбинации антител против CD71 ADC и активируемых антител против CD71 ADC

№. комбинации	Тяжелая цепь (HC) или вариабельная область HC, SEQ ID No.	Легкая цепь (LC) или вариабельная область LC, SEQ ID No.	Линкер	Токсин
1	5	7	vc	MMAD
2	5	7	PEG2-vc	MMAD
3	5	7	vc	MMAE
4	5	7	vc	дуокармицин
5	5	7	spdb	DM4
6	325	323	vc	MMAD
7	325	323	PEG2-vc	MMAD
8	325	323	vc	MMAE
9	325	323	vc	дуокармицин
10	325	323	spdb	DM4
11	325	327	vc	MMAD
12	325	327	PEG2-vc	MMAD
13	325	327	vc	MMAE
14	325	327	vc	дуокармицин
15	325	327	spdb	DM4
16	5	810	vc	MMAD
17	5	810	PEG2-vc	MMAD
18	5	810	vc	MMAE
19	5	810	vc	дуокармицин
20	5	810	spdb	DM4

21	325	329	vc	MMAD
22	325	329	PEG2-vc	MMAD
23	325	329	vc	ММАЕ
24	325	329	vc	дуокармицин
25	325	329	spdb	DM4
26	5	812	vc	MMAD
27	5	812	PEG2-vc	MMAD
28	5	812	vc	ММАЕ
29	5	812	vc	дуокармицин
30	5	812	spdb	DM4
31	325	331	vc	MMAD
32	325	331	PEG2-vc	MMAD
33	325	331	vc	ММАЕ
34	325	331	vc	дуокармицин
35	325	331	spdb	DM4
36	5	814	vc	MMAD
37	5	814	PEG2-vc	MMAD
38	5	814	vc	ММАЕ
39	5	814	vc	дуокармицин
40	5	814	spdb	DM4
41	325	333	vc	MMAD
42	325	333	PEG2-vc	MMAD
43	325	333	vc	ММАЕ
44	325	333	vc	дуокармицин
45	325	333	spdb	DM4
46	5	816	vc	MMAD
47	5	816	PEG2-vc	MMAD
48	5	816	vc	ММАЕ
49	5	816	vc	дуокармицин
50	5	816	spdb	DM4
51	325	335	vc	MMAD
52	325	335	PEG2-vc	MMAD
53	325	335	vc	ММАЕ
54	325	335	vc	дуокармицин
55	325	335	spdb	DM4
56	5	818	vc	MMAD
57	5	818	PEG2-vc	MMAD
58	5	818	vc	ММАЕ
59	5	818	vc	дуокармицин
60	5	818	spdb	DM4
61	325	337	vc	MMAD
62	325	337	PEG2-vc	MMAD
63	325	337	vc	ММАЕ
64	325	337	vc	дуокармицин
65	325	337	spdb	DM4
66	5	820	vc	MMAD
67	5	820	PEG2-vc	MMAD
68	5	820	vc	ММАЕ
69	5	820	vc	дуокармицин

042024

70	5	820	spdb	DM4
71	325	673	vc	MMAD
72	325	673	PEG2-vc	MMAD
73	325	673	vc	ММАЕ
74	325	673	vc	дуокармицин
75	325	673	spdb	DM4
76	5	824	vc	MMAD
77	5	824	PEG2-vc	MMAD
78	5	824	vc	ММАЕ
79	5	824	vc	дуокармицин
80	5	824	spdb	DM4
81	325	702	vc	MMAD
82	325	702	PEG2-vc	MMAD
83	325	702	vc	ММАЕ
84	325	702	vc	дуокармицин
85	325	702	spdb	DM4
86	5	826	vc	MMAD
87	5	826	PEG2-vc	MMAD
88	5	826	vc	ММАЕ
89	5	826	vc	дуокармицин
90	5	826	spdb	DM4
91	325	671	vc	MMAD
92	325	671	PEG2-vc	MMAD
93	325	671	vc	ММАЕ
94	325	671	vc	дуокармицин
95	325	671	spdb	DM4
96	5	822	vc	MMAD
97	5	822	PEG2-vc	MMAD
98	5	822	vc	ММАЕ
99	5	822	vc	дуокармицин
100	5	822	spdb	DM4
101	325	704	vc	MMAD
102	325	704	PEG2-vc	MMAD
103	325	704	vc	ММАЕ
104	325	704	vc	дуокармицин
105	325	704	spdb	DM4
106	5	828	vc	MMAD
107	5	828	PEG2-vc	MMAD
108	5	828	vc	ММАЕ
109	5	828	vc	дуокармицин
110	5	828	spdb	DM4
111	325	706	vc	MMAD
112	325	706	PEG2-vc	MMAD
113	325	706	vc	ММАЕ
114	325	706	vc	дуокармицин
115	325	706	spdb	DM4
116	5	830	vc	MMAD
117	5	830	PEG2-vc	MMAD
118	5	830	vc	ММАЕ

042024

119	5	830	vc	дуокармицин
120	5	830	spdb	DM4
121	325	708	vc	MMAD
122	325	708	PEG2-vc	MMAD
123	325	708	vc	ММАЕ
124	325	708	vc	дуокармицин
125	325	708	spdb	DM4
126	5	832	vc	MMAD
127	5	832	PEG2-vc	MMAD
128	5	832	vc	ММАЕ
129	5	832	vc	дуокармицин
130	5	832	spdb	DM4
131	325	710	vc	MMAD
132	325	710	PEG2-vc	MMAD
133	325	710	vc	ММАЕ
134	325	710	vc	дуокармицин
135	325	710	spdb	DM4
136	5	834	vc	MMAD
137	5	834	PEG2-vc	MMAD
138	5	834	vc	ММАЕ
139	5	834	vc	дуокармицин
140	5	834	spdb	DM4
141	325	712	vc	MMAD
142	325	712	PEG2-vc	MMAD
143	325	712	vc	ММАЕ
144	325	712	vc	дуокармицин
145	325	712	spdb	DM4
146	5	836	vc	MMAD
147	5	836	PEG2-vc	MMAD
148	5	836	vc	ММАЕ
149	5	836	vc	дуокармицин
150	5	836	spdb	DM4
151	325	323	vc	MMAD
152	325	323	PEG2-vc	MMAD
153	325	323	vc	ММАЕ
154	325	323	vc	дуокармицин
155	325	323	spdb	DM4
156	325	650	vc	MMAD
157	325	650	PEG2-vc	MMAD
158	325	650	vc	ММАЕ
159	325	650	vc	дуокармицин
160	325	650	spdb	DM4
161	5	809	vc	MMAD
162	5	809	PEG2-vc	MMAD
163	5	809	vc	ММАЕ
164	5	809	vc	дуокармицин
165	5	809	spdb	DM4
166	325	652	vc	MMAD
167	325	652	PEG2-vc	MMAD

042024

168	325	652	vc	ММАЕ
169	325	652	vc	дуокармицин
170	325	652	spdb	DM4
171	5	811	vc	ММАД
172	5	811	PEG2-vc	ММАД
173	5	811	vc	ММАЕ
174	5	811	vc	дуокармицин
175	5	811	spdb	DM4
176	325	654	vc	ММАД
177	325	654	PEG2-vc	ММАД
178	325	654	vc	ММАЕ
179	325	654	vc	дуокармицин
180	325	654	spdb	DM4
181	5	813	vc	ММАД
182	5	813	PEG2-vc	ММАД
183	5	813	vc	ММАЕ
184	5	813	vc	дуокармицин
185	5	813	spdb	DM4
186	325	656	vc	ММАД
187	325	656	PEG2-vc	ММАД
188	325	656	vc	ММАЕ
189	325	656	vc	дуокармицин
190	325	656	spdb	DM4
191	5	815	vc	ММАД
192	5	815	PEG2-vc	ММАД
193	5	815	vc	ММАЕ
194	5	815	vc	дуокармицин
195	5	815	spdb	DM4
196	325	658	vc	ММАД
197	325	658	PEG2-vc	ММАД
198	325	658	vc	ММАЕ
199	325	658	vc	дуокармицин
200	325	658	spdb	DM4
201	5	817	vc	ММАД
202	5	817	PEG2-vc	ММАД
203	5	817	vc	ММАЕ
204	5	817	vc	дуокармицин
205	5	817	spdb	DM4
206	325	660	vc	ММАД
207	325	660	PEG2-vc	ММАД
208	325	660	vc	ММАЕ
209	325	660	vc	дуокармицин
210	325	660	spdb	DM4
211	5	819	vc	ММАД
212	5	819	PEG2-vc	ММАД
213	5	819	vc	ММАЕ
214	5	819	vc	дуокармицин
215	5	819	spdb	DM4
216	325	672	vc	ММАД

217	325	672	PEG2-vc	MMAD
218	325	672	vc	ММАЕ
219	325	672	vc	дуокармицин
220	325	672	spdb	DM4
221	5	823	vc	MMAD
222	5	823	PEG2-vc	MMAD
223	5	823	vc	ММАЕ
224	5	823	vc	дуокармицин
225	5	823	spdb	DM4
226	325	701	vc	MMAD
227	325	701	PEG2-vc	MMAD
228	325	701	vc	ММАЕ
229	325	701	vc	дуокармицин
230	325	701	spdb	DM4
231	5	825	vc	MMAD
232	5	825	PEG2-vc	MMAD
233	5	825	vc	ММАЕ
234	5	825	vc	дуокармицин
235	5	825	spdb	DM4
236	325	670	vc	MMAD
237	325	670	PEG2-vc	MMAD
238	325	670	vc	ММАЕ
239	325	670	vc	дуокармицин
240	325	670	spdb	DM4
241	5	821	vc	MMAD
242	5	821	PEG2-vc	MMAD
243	5	821	vc	ММАЕ
244	5	821	vc	дуокармицин
245	5	821	spdb	DM4
246	325	703	vc	MMAD
247	325	703	PEG2-vc	MMAD
248	325	703	vc	ММАЕ
249	325	703	vc	дуокармицин
250	325	703	spdb	DM4
251	5	827	vc	MMAD
252	5	827	PEG2-vc	MMAD
253	5	827	vc	ММАЕ
254	5	827	vc	дуокармицин
255	5	827	spdb	DM4
256	325	705	vc	MMAD
257	325	705	PEG2-vc	MMAD
258	325	705	vc	ММАЕ
259	325	705	vc	дуокармицин
260	325	705	spdb	DM4
261	5	829	vc	MMAD
262	5	829	PEG2-vc	MMAD
263	5	829	vc	ММАЕ
264	5	829	vc	дуокармицин
265	5	829	spdb	DM4
266	325	707	vc	MMAD
267	325	707	PEG2-vc	MMAD
268	325	707	vc	ММАЕ
269	325	707	vc	дуокармицин
270	325	707	spdb	DM4
271	5	831	vc	MMAD
272	5	831	PEG2-vc	MMAD
273	5	831	vc	ММАЕ
274	5	831	vc	дуокармицин
275	5	831	spdb	DM4
276	325	709	vc	MMAD
277	325	709	PEG2-vc	MMAD
278	325	709	vc	ММАЕ
279	325	709	vc	дуокармицин
280	325	709	spdb	DM4
281	5	833	vc	MMAD
282	5	833	PEG2-vc	MMAD
283	5	833	vc	ММАЕ
284	5	833	vc	дуокармицин
285	5	833	spdb	DM4
286	325	711	vc	MMAD
287	325	711	PEG2-vc	MMAD
288	325	711	vc	ММАЕ
289	325	711	vc	дуокармицин
290	325	711	spdb	DM4
291	5	835	vc	MMAD
292	5	835	PEG2-vc	MMAD
293	5	835	vc	ММАЕ
294	5	835	vc	дуокармицин
295	5	835	spdb	DM4

Конъюгат антитела с лекарственным средством (ADC) по настоящему описанию или конъюгат активированного антитела с лекарственным средством (AADC) по настоящему описанию может содержать один или несколько полипептидов, включающих в себя комбинацию аминокислотных последовательностей, линкера и токсина, перечисленных в данной строке из табл. F. Таким образом, конъюгат антитела с лекарственным средством (ADC) по настоящему описанию или конъюгат активированного антитела с ле-

карственным средством (AADC) по настоящему описанию, включающий в себя комбинацию аминокислотных последовательностей, линкера и токсина, перечисленных в данной строке или представленных в форме конкретной комбинации, описан в настоящем документе. Например, конъюгат активируемого антитела с лекарственным средством по настоящему описанию может содержать аминокислотные последовательности из комбинации по. 45, включающей в себя тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 325, легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 333, и линкер-токсин spdb-DM4. В другом примере AADC, раскрытых и описанных в настоящем документе, конъюгат активируемого антитела с лекарственным средством по настоящему описанию может содержать аминокислотные последовательности из комбинации по. 33, включающей в себя тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 325, легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 331, и линкер-токсин vc-MMAE.

Любую из комбинаций в табл. F, где перечислены переменные области тяжелой цепи и легкой цепи, можно комбинировать с константными областями иммуноглобулина человека для получения полностью человеческого IgG, включая IgG1, IgG2, IgG4, или с мутантными константными областями для получения IgG человека с измененными функциями, такими как IgG1 N297A, IgG1 N297Q или IgG4 S228P. Комбинации, описанные в табл. F, не являются ограниченными конкретными комбинациями, показанными в любой данной строке, и таким образом, могут включать в себя любую последовательность тяжелой цепи или последовательность переменной области тяжелой цепи из столбца 2 из табл. F, комбинированную с любой последовательностью легкой цепи или последовательностью переменной области легкой цепи из столбца 3 из табл. F, комбинированную с любым линкером из столбца 4, комбинированную с любым токсином из столбца 5. В дополнение к последовательностям тяжелой цепи или последовательностям переменной области тяжелой цепи, перечисленным в столбце 2, любую последовательность тяжелой цепи или последовательность переменной области тяжелой цепи, описанные в настоящем документе, можно использовать в комбинации. В дополнение к последовательностям легкой цепи или последовательностям переменной области легкой цепи, перечисленным в столбце 3, любую последовательность легкой цепи или последовательность переменной области легкой цепи, описанные в настоящем документе, можно использовать в комбинации. В дополнение к линкерам, перечисленным в столбце 4, любой линкер, описанный в настоящем документе, можно использовать в комбинации. В дополнение к токсинам, перечисленным в столбце 5, любой токсин, описанный в настоящем документе, можно использовать в комбинации.

В некоторых вариантах осуществления время полужизни в сыворотке активируемого антитела дольше, чем у соответствующего антитела; например, рК активируемого антитела дольше, чем у соответствующего антитела. В некоторых вариантах осуществления время полужизни в сыворотке активируемого антитела является сходным со временем полужизни соответствующего антитела. В некоторых вариантах осуществления время полужизни в сыворотке активируемого антитела составляет по меньшей мере 15 суток после введения в организм. В некоторых вариантах осуществления время полужизни в сыворотке активируемого антитела составляет по меньшей мере 12 суток после введения в организм. В некоторых вариантах осуществления время полужизни в сыворотке активируемого антитела составляет по меньшей мере 11 суток после введения в организм. В некоторых вариантах осуществления время полужизни в сыворотке активируемого антитела составляет по меньшей мере 10 суток после введения в организм. В некоторых вариантах осуществления время полужизни в сыворотке активируемого антитела составляет по меньшей мере 9 суток после введения в организм. В некоторых вариантах осуществления время полужизни в сыворотке активируемого антитела составляет по меньшей мере 8 суток после введения в организм. В некоторых вариантах осуществления время полужизни в сыворотке активируемого антитела составляет по меньшей мере 7 суток после введения в организм. В некоторых вариантах осуществления время полужизни в сыворотке активируемого антитела составляет по меньшей мере 6 суток после введения в организм. В некоторых вариантах осуществления время полужизни в сыворотке активируемого антитела составляет по меньшей мере 5 суток после введения в организм. В некоторых вариантах осуществления время полужизни в сыворотке активируемого антитела составляет по меньшей мере 4 суток после введения в организм. В некоторых вариантах осуществления время полужизни в сыворотке активируемого антитела составляет по меньшей мере 3 суток после введения в организм. В некоторых вариантах осуществления время полужизни в сыворотке активируемого антитела составляет по меньшей мере 2 суток после введения в организм. В некоторых вариантах осуществления время полужизни в сыворотке активируемого антитела составляет по меньшей мере 24 ч после введения в организм. В некоторых вариантах осуществления время полужизни в сыворотке активируемого антитела составляет по меньшей мере 20 ч после введения в организм. В некоторых вариантах осуществления время полужизни в сыворотке активируемого антитела составляет по меньшей мере 18 ч после введения в организм. В некоторых вариантах осуществления время полужизни в сыворотке активируемого антитела составляет по меньшей мере 16 ч после введения в организм. В некоторых вариантах осуществления время полужизни в сыворотке активируемого антитела составляет по меньшей мере 14 ч после введения в организм. В некоторых вариантах осуществления время полужизни в сыворотке активируемого антитела составляет по меньшей мере 12 ч после введения в организм. В некоторых вариантах осуществления время полу-

жизни в сыворотке активируемого антитела составляет по меньшей мере 10 ч после введения в организм. В некоторых вариантах осуществления время полужизни в сыворотке активируемого антитела составляет по меньшей мере 8 ч после введения в организм. В некоторых вариантах осуществления время полужизни в сыворотке активируемого антитела составляет по меньшей мере 6 ч после введения в организм. В некоторых вариантах осуществления время полужизни в сыворотке активируемого антитела составляет по меньшей мере 4 ч после введения в организм. В некоторых вариантах осуществления время полужизни в сыворотке активируемого антитела составляет по меньшей мере 3 ч после введения в организм.

В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело против CD71 и/или конъюгированное активируемое антитело против CD71 является моноспецифическим. В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело против CD71 и/или конъюгированное активируемое антитело против CD71 является мультиспецифическим, например, в качестве неограничивающего примера, биспецифическим или трифункциональным. В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело против CD71 и/или конъюгированное активируемое антитело против CD71 составляют в форме части промоллекулы привлекающего Т-клетки биспецифического активатора (BITE). В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело против CD71 и/или конъюгированное активируемое антитело против CD71 составляют в форме части химерного прорецептора антигена (CAR), модифицированной Т-клетки или другого сконструированного рецептора.

В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент включены в мультиспецифическое активируемое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, где по меньшей мере одно плечо мультиспецифического активируемого антитела специфически связывает CD71. В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент включены в биспецифическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, где по меньшей мере одно плечо биспецифического активируемого антитела специфически связывает CD71.

В некоторых вариантах осуществления антитела против CD71, конъюгированные антитела против CD71, активируемые антитела против CD71 и/или конъюгированные активируемые антитела против CD71, описанные в настоящем документе, используют в сочетании с одним или несколькими дополнительными средствами или комбинацией дополнительных средств. Пригодные дополнительные средства включают в себя современные фармацевтические и/или хирургические терапевтические средства для намеченного применения, например, такого как против злокачественной опухоли. Например, антитела против CD71, конъюгированные антитела против CD71, активируемые антитела против CD71 и/или конъюгированные активируемые антитела против CD71 можно использовать в сочетании с дополнительным химиотерапевтическим или антинеопластическим средством.

В некоторых вариантах осуществления дополнительное средство(средства) представляет собой химиотерапевтическое средство, такое как химиотерапевтическое средство, выбранное из группы, состоящей из доцетаксела, паклитаксела, абраксана (т.е., конъюгированного с альбумином паклитаксела), доксорубина, оксалиплатина, карбоплатина, цисплатина, иринотекана и гемцитабина.

В некоторых вариантах осуществления дополнительное средство(средства) представляет собой ингибитор контрольной точки, ингибитор киназы, ингибиторы нацеливания средства в микроокружении опухолей и/или агониста Т-клеток или NK. В некоторых вариантах осуществления дополнительное средство (средства) представляет собой радиотерапию, отдельно или в комбинации с другим дополнительным средством(средствами), такими как химиотерапевтическое средство или антинеопластическое средство. В некоторых вариантах осуществления дополнительное средство(средства) представляет собой вакцину, онковирус, и/или активирующее DC средство, такое как, в качестве неограничивающего примера, агонист toll-подобного рецептора (TLR) и/или α -CD40. В некоторых вариантах осуществления дополнительное средство(средства) представляет собой нацеленное на опухоли антитело, разработанное для уничтожения опухоли посредством ADCC или посредством прямой конъюгации с токсином (например, конъюгат антитела с лекарственным средством (ADC).

В некоторых вариантах осуществления ингибитор контрольной точки представляет собой ингибитор мишени, выбранной из группы, состоящей из CTLA-4, LAG-3, PD-1, CD71, TIGIT, TIM-3, B7H4 и Vista. В некоторых вариантах осуществления, ингибитор киназы выбран из группы, состоящей из ингибиторов B-RAF_i, MEK_i и Btk, таких как ибрутиниб. В некоторых вариантах осуществления ингибитор киназы представляет собой кризотиниб. В некоторых вариантах осуществления ингибитор микроокружения опухолей выбран из группы, состоящей из ингибитора IDO, ингибитора α -CSF1R, ингибитора α -CCR4, TGF-бета, супрессорной клетки миелоидного происхождения или регуляторной Т-клетки. В некоторых вариантах осуществления агонист выбран из группы, состоящей из O \times 40, GITR, CD137, ICOS, CD27 и HVEM.

В некоторых вариантах осуществления ингибитор представляет собой ингибитор CTLA-4. В некоторых вариантах осуществления, ингибитор представляет собой ингибитор LAG-3. В некоторых вариантах осуществления, ингибитор представляет собой ингибитор PD-1. В некоторых вариантах осуществления ингибитор представляет собой ингибитор CD71. В некоторых вариантах осуществления ингибитор представляет собой ингибитор TIGIT. В некоторых вариантах осуществления ингибитор представляет

собой ТИМ-3. В некоторых вариантах осуществления ингибитор представляет собой ингибитор B7H4. В некоторых вариантах осуществления ингибитор представляет собой ингибитор Vista. В некоторых вариантах осуществления ингибитор представляет собой ингибитор B-RAF_i. В некоторых вариантах осуществления ингибитор представляет собой ингибитор MEK_i. В некоторых вариантах осуществления ингибитор представляет собой ингибитор Vtk. В некоторых вариантах осуществления ингибитор представляет собой ибрутиниб. В некоторых вариантах осуществления ингибитор представляет собой кризотиниб. В некоторых вариантах осуществления ингибитор представляет собой ингибитор IDO. В некоторых вариантах осуществления ингибитор представляет собой ингибитор α-CSF1R. В некоторых вариантах осуществления ингибитор представляет собой ингибитор α-CCR4. В некоторых вариантах осуществления ингибитор представляет собой TGF-бета. В некоторых вариантах осуществления ингибитор представляет собой супрессорную клетку миелоидного происхождения. В некоторых вариантах осуществления ингибитор представляет собой регуляторную Т-клетку.

В некоторых вариантах осуществления агонист представляет собой O×40. В некоторых вариантах осуществления агонист представляет собой GITR. В некоторых вариантах осуществления агонист представляет собой CD137. В некоторых вариантах осуществления агонист представляет собой ICOS. В некоторых вариантах осуществления агонист представляет собой CD27. В некоторых вариантах осуществления агонист представляет собой HVEM.

В некоторых вариантах осуществления антитело, конъюгированное антитело, активируемое антитело и/или конъюгированное активируемое антитело против CD71 вводят во время и/или после лечения в комбинации с одним или несколькими дополнительными средствами, например, такими как химиотерапевтическое средство, противовоспалительное средство, и/или иммуносупрессивное средство. В некоторых вариантах осуществления антитело против CD71, конъюгированное антитело против CD71, активируемое антитело против CD71 и/или конъюгированное активируемое антитело против CD71 и дополнительное средство составляют в одной терапевтической композиции, и антитело против CD71, конъюгированное антитело против CD71, активируемое антитело против CD71 и/или конъюгированное активируемое антитело против CD71 и дополнительное средство вводят одновременно. Альтернативно, антитело против CD71, конъюгированное антитело против CD71, активируемое антитело против CD71 и/или конъюгированное активируемое антитело против CD71 и дополнительное средство отделяют друг от друга, например, каждое составляют в отдельной терапевтической композиции, и антитело против CD71, конъюгированное антитело против CD71, активируемое антитело против CD71 и/или конъюгированное активируемое антитело против CD71 и дополнительное средство вводят одновременно, или антитело против CD71, конъюгированное антитело против CD71, активируемое антитело против CD71 и/или конъюгированное активируемое антитело против CD71 и дополнительное средство вводят в различные периоды времени в ходе режима лечения. Например, антитело против CD71, конъюгированное антитело против CD71, активируемое антитело против CD71 и/или конъюгированное активируемое антитело против CD71 вводят до введения дополнительного средства, антитело против CD71, конъюгированное антитело против CD71, активируемое антитело против CD71 и/или конъюгированное активируемое антитело против CD71 вводят после введения дополнительного средства, или антитело против CD71, конъюгированное антитело против CD71, активируемое антитело против CD71 и/или конъюгированное активируемое антитело против CD71 и дополнительное средство вводят в режиме чередования. Как описано в настоящем документе, антитело против CD71, конъюгированное антитело против CD71, активируемое антитело против CD71 и/или конъюгированное активируемое антитело против CD71 и дополнительное средство вводят в однократных дозах или в множественных дозах.

В некоторых вариантах осуществления антитело против CD71, конъюгированное антитело против CD71, активируемое антитело против CD71 и/или конъюгированное активируемое антитело против CD71 и дополнительное средство(средства) вводят одновременно. Например, антитело против CD71, конъюгированное антитело против CD71, активируемое антитело против CD71 и/или конъюгированное активируемое антитело против CD71 и дополнительное средство(средства) можно составлять в одной композиции или вводить в форме двух или более отдельных композиций. В некоторых вариантах осуществления антитело против CD71, конъюгированное антитело против CD71, активируемое антитело против CD71 и/или конъюгированное активируемое антитело против CD71 и дополнительное средство(средства) вводят последовательно, или антитело против CD71, конъюгированное антитело против CD71, активируемое антитело против CD71 и/или конъюгированное активируемое антитело против CD71 и дополнительное средство вводят в различные периоды времени в ходе режима лечения.

В некоторых вариантах осуществления антитело против CD71, конъюгированное антитело против CD71, активируемое антитело против CD71 и/или конъюгированное активируемое антитело против CD71 вводят во время и/или после лечения в комбинации с одним или несколькими дополнительными средствами, такими как в качестве неограничивающего примера химиотерапевтическое средство, противовоспалительное средство и/или иммуносупрессивное средство, такое как алкилирующее средство, антимаетаболит, средство против микротрубочек, ингибитор топоизомеразы, цитотоксический антибиотик и/или любое другое повреждающее нуклеиновую кислоту средство. В некоторых вариантах осуществле-

ния дополнительное средство представляет собой таксан, такой как паклитаксел (например, абраксан®). В некоторых вариантах осуществления дополнительное средство представляет собой антиметаболит, такой как гемцитабин. В некоторых вариантах осуществления дополнительное средство представляет собой алкилирующее средство, такое как химиотерапевтическое средство на основе платины, такое как карбоплатин или цисплатин. В некоторых вариантах осуществления дополнительное средство представляет собой нацеливающее средство, такое как ингибитор киназы, например, сорафениб или эрлотиниб. В некоторых вариантах осуществления дополнительное средство представляет собой нацеливающее средство, такое как другое антитело, например, моноклональное антитело (например, бевацизумаб), биспецифическое антитело или мультиспецифическое антитело. В некоторых вариантах осуществления дополнительное средство представляет собой ингибитор протеасомы, такой как бортезомиб или карфилзомиб. В некоторых вариантах осуществления дополнительное средство представляет собой иммуномодулирующее средство, такое как ленолидомид или IL-2. В некоторых вариантах осуществления дополнительное средство представляет собой радиоактивное облучение. В некоторых вариантах осуществления дополнительное средство представляет собой средство, рассматриваемое специалистами в данной области как стандарт лечения. В некоторых вариантах осуществления дополнительное средство представляет собой химиотерапевтическое средство, хорошо известное специалистам в данной области.

В некоторых вариантах осуществления дополнительное средство представляет собой другое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, другое конъюгированное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, другое активируемое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, и/или другое конъюгированное активируемое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент. В некоторых вариантах осуществления дополнительное средство представляет собой другое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, другое конъюгированное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, другое активируемое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, и/или другое конъюгированное активируемое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент против той же мишени, что и первое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, первое конъюгированное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, активируемое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, и/или конъюгированное активируемое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, например, против CD71. В некоторых вариантах осуществления дополнительное средство представляет собой другое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, другое конъюгированное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, другое активируемое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, и/или другое конъюгированное активируемое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент против мишени, отличной от мишени первого антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, первого конъюгированного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, активируемого антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, и/или конъюгированного активируемого антитела или его антигенсвязывающего фрагмента.

В качестве неограничивающего примера антитело или антигенсвязывающий фрагмент и/или АВ активируемого антитела является партнером по связыванию для любой мишени из перечисленных в табл. 1.

Таблица 1. Иллюстративные мишени

I-92-LFA-3	CD52	DL44	HVEM	LIF-R	STEAP1
Интегрин альфа-4	CD56	DLK1	Гиалуронидаза	Lewis X	STEAP2
Интегрин альфа-V	CD64	DLL4	ICOS	LIGHT	TAG-72
Интегрин альфа4бета1	CD70	DPP-4	IFNальфа	LRP4	TAPA1
Интегрин альфа4бета7	CD71	DSC1	IFNбета	LRRRC26	TCFбета
AGR2	CD74	EGFR	IFNгамма	MCSP	TIGIT
Анти-Lewis-Y		EGFRviii	IgE	Месотелин	TIM-3
Рецептор апеллина J	CD80	Рецептор эндотелина B (ETBR)	Рецептор IgE	MRP4	TLR2
APRIL	CD81	ENPP3	IGF	MUC1	TLR4

B7-H4	CD86	ЕрсАМ	IGF1R	Муцин-16 (MUC16, CA-125)	TLR6
BAFF	CD95	ЕРНА2	IL1B	Na/K АТФаза	TLR7
BTLA	CD117	ЕРНВ2	IL1R	Эластаза нейтрофилов	TLR8
Компонент комплемента C5	CD125	ЕРВВ3	IL2	NGF	TLR9
C-242	CD132 (IL-2RG)	F белок of RSV	IL11	Никастрин	TMEM31
CA9	CD133	FAP	IL12	Рецепторы Notch	TNFальфа
CA19-9 (Lewis a)	CD137	FGF-2	IL12p40	Notch 1	TNFR
Карбоангидраз а ₉	CD138	FGF8	IL-12R, IL-12Rbeta1	Notch 2	TNFRS12A
CD2	CD166	FGFR1	IL13	Notch 3	TRAIL-R1
CD3	CD172A	FGFR2	IL13R	Notch 4	TRAIL-R2
CD6	CD248	FGFR3	IL15	NOV	Трансферрин
CD9	CDH6	FGFR4	IL17	OSM-R	Рецептор трансферрина
CD11a	CEACAM5 (CEA)	Рецептор фолата	IL18	OX-40	TRK-A
CD19	CEACAM6 (NCA- 90)	GAL3ST1	IL21	PAR2	TRK-B
CD20	КЛАУДИН-3	G-CSF	IL23	PDGF-AA	uPAR
CD22	КЛАУДИН-4	G-CSFR	IL23R	PDGF-BB	VAP1
CD24	cMet	GD2	IL27/IL27R (wsx1)	PDGFRальфа	VCAM-1
CD25	Коллаген	GITR	IL29	PDGFRбета	VEGF
CD27	Cripto	GLUT1	IL-31R	PD-1	VEGF-A
CD28	CSFR	GLUT4	IL31/IL31R	PD-L1	VEGF-B
CD30	CSFR-1	GM-CSF	IL2R	PD-L2	VEGF-C
CD33	CTLA-4	GM-CSFR	IL4	Фосфатидил- серин	VEGF-D
CD38	CTGF	Рецепторы IIb/IIIa	GP IL4R	PlGF	VEGFR1
CD40	CXCL10	Gp130	IL6, IL6R	PSCA	VEGFR2
CD40L	CXCL13	GP11b/IIIa	Рецептор инсулина	PSMA	VEGFR3
CD41	CXCR1	GFNMB	Лиганды Jagged	RAAG12	VISTA
CD44	CXCR2	GRP78	Jagged 1	RAGE	WISP-1
CD44v6		HER2/neu	Jagged 2	SLC44A4	WISP-2
CD47	CXCR4	HGF	LAG-3	Сфингозин-1- фосфат	WISP-3
CD51	CYR61	hGH			

В качестве неограничивающего примера антитело или антигенсвязывающий фрагмент и/или АВ активированного антитела представляет собой антитело или происходит из антитела из перечисленных в табл. 2.

Таблица 2. Иллюстративные источники Ab

Торговое наименование антитела (наименование антитела)	Мишень
Авастин TM (бевацизумаб)	VEGF
Люцентис TM (ранибизумаб)	VEGF
Эрбитукс TM (цетуксимаб)	EGFR
Вектибикс TM (панитумумаб)	EGFR
Ремикейд TM (инфликсимаб)	TNF α
Хумира TM (адалимумаб)	TNF α
Тисабри TM (натализумаб)	Интегрин α 4
Симулект TM (базиликсимаб)	IL2R
Солирис TM (экулизумаб)	Компонент комплемента C5
Раптива TM (эфализумаб)	CD11a
Бексар TM (тозитумомаб)	CD20
Зевалин TM (тиуксетан ибритутомаба)	CD20
Ритуксан TM (ритуксимаб)	CD20
Окрелизумаб	CD20
Арзерра TM (офатумумаб)	CD20
Газива TM (обинутузумаб)	CD20
Зенапакс TM (даклизумаб)	CD25
Адцетрис TM (ведотин брентуксимаба)	CD30
Миелотарг TM (гемтузумаб)	CD33
Милотарг TM (озогамицин гемтузумаба)	CD33
Кампат TM (алемтузумаб)	CD52
РеоPro TM (абциксимаб)	Рецептор гликопротеина IIb/IIIa
Ксолар TM (омализумаб)	IgE
Герцептин TM (трастузумаб)	Her2
Кадсила TM (эмтанзин трастузумаба)	Her2
Синагис TM (паливизумаб)	Велок F RSV
(ипилимумаб)	CTLA-4
(тремелимумаб)	CTLA-4
Hu5c8	CD40L
(пертузумаб)	Her2-neu
(эртумаксомаб)	CD3/Her2-neu
Оренсия TM (абатацепт)	CTLA-4
(танезумаб)	NGF
(бавитуксимаб)	Фосфатидилсерин
(залутумумаб)	EGFR
(мапатумумаб)	EGFR
(матузумаб)	EGFR
(нимотузумаб)	EGFR
ICR62	EGFR
mAb 528	EGFR
CN806	EGFR
MDX-447	EGFR/CD64
(эдреколомаб)	EpCAM
RAV12	RAAG12
huJ591	PSMA
Энбрел TM (этанерцепт)	TNF-R
Амевив TM (алефацепт)	1-92-LFA-3
Антрил TM , Кинерет TM (анакира)	IL-1Ra
GS1008	TGFбета
	Notch, например, Notch 1
	Jagged 1 или Jagged 2
(адекватумумаб)	EpCAM
(фигитумумаб)	IGF1R
(тоцилизумаб)	Рецептор IL-6
Стелара TM (устекинумаб)	IL-12/IL-23
Пролиа TM (деносумаб)	RANKL

В некоторых вариантах осуществления дополнительное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, конъюгированное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, активируемое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, и/или конъюгированное активируемое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент представляет собой моноклональные антитело, доменное антитело, отдельную цепь, фрагмент Fab, фрагмент F(ab')₂, scFv, scAb, dAb, антитело из одиночного домена тяжелой цепи или антитело из одиночного домена легкой цепи. В некоторых вариантах осуществления, дополнительное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, конъюгированное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, активируемое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, и/или конъюгированное активируемое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент представляет собой антитело мыши, другого грызуна, химерное, гуманизированное или полностью человеческое моноклональное ан-

титело.

Описание относится также к способам получения полипептида антитела против CD71 и/или активируемого антитела против CD71 посредством культивирования клетки в условиях, обеспечивающих экспрессию полипептида, где клетка содержит выделенную молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую антитело и/или активируемое антитело, описанное в настоящем документе, и/или векторы, содержащие эти выделенные последовательности нуклеиновой кислоты. Описание относится к способам получения антитела и/или активируемого антитела посредством культивирования клетки в условиях, обеспечивающих экспрессию антитела и/или активируемого антитела, где клетка содержит выделенную молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую антитело и/или активируемое антитело, описанное в настоящем документе, и/или векторы, содержащие эти выделенные последовательности нуклеиновой кислоты.

Изобретение относится также к способу изготовления активируемых антител, которые в активированном состоянии связывают CD71, посредством (а) культивирования клетки, содержащей конструкцию нуклеиновой кислоты, кодирующую активируемое антитело, в условиях, обеспечивающих экспрессию активируемого антитела, где активируемое антитело содержит маскирующую группу (ММ), расщепляемую группу (СМ) и антитело или его антигенсвязывающий фрагмент (АВ), специфически связывающие CD71, (i) где СМ представляет собой полипептид, функционирующий в качестве субстрата для протеазы; и (ii) где СМ расположена в активируемом антителе таким образом, что, когда активируемое антитело находится в нерасщепленном состоянии, ММ мешает специфическому связыванию АВ с CD71, и в расщепленном состоянии ММ не создает помехи или конкуренцию специфическому связыванию АВ с CD71; и (b) выделения активируемого антитела. Пригодные АВ, ММ, и/или СМ включают в себя любые из АВ, ММ и/или СМ, описанных в настоящем документе.

В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело в нерасщепленном состоянии обладает следующей структурной аранжировкой от N-конца к C-концу: ММ-СМ-АВ или АВ-СМ-ММ. В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело содержит связывающий пептид между ММ и СМ. В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело содержит связывающий пептид между СМ и АВ. В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело содержит первый связывающий пептид (LP1) и второй связывающий пептид (LP2), и где активируемое антитело в нерасщепленном состоянии обладает следующей структурной аранжировкой от N-конца к C-концу: ММ-LP1-СМ-LP2-АВ или АВ-LP2-СМ-LP1-ММ. В некоторых вариантах осуществления два связывающих пептида не обязательно должны быть идентичны друг другу. В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело в нерасщепленном состоянии обладает следующей структурной аранжировкой от N-конца к C-концу: спейсер-ММ-LP1-СМ-LP2-АВ или АВ-LP2-СМ-LP1-ММ-спейсер.

В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один из LP1 или LP2 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из (GS)_n, (GGS)_n, (GSGGS)_n (SEQ ID NO: 339) и (GGGS)_n (SEQ ID NO: 340), где n представляет собой целое число по меньшей мере один.

В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один из LP1 или LP2 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из GGSG (SEQ ID NO: 341), GSGGG (SEQ ID NO: 342), GSGSG (SEQ ID NO: 343), GSGGG (SEQ ID NO: 344), GGGSG (SEQ ID NO: 345) и GSSSG (SEQ ID NO: 346).

В некоторых вариантах осуществления LP1 содержит аминокислотную последовательность GSSGGSGGGSG (SEQ ID NO: 347), GSSGGSGGGSG (SEQ ID NO: 348), GSSGGSGGGSGS (SEQ ID NO: 349), GSSGGSGGGSGGGS (SEQ ID NO: 350), GSSGGSGGGSG (SEQ ID NO: 351) или GSSGGSGGGSGS (SEQ ID NO: 352).

В некоторых вариантах осуществления LP2 содержит аминокислотную последовательность GSS, GGS, GGGS (SEQ ID NO: 353), GSSGT (SEQ ID NO: 354) или GSSG (SEQ ID NO: 356).

Изобретение относится к способам предотвращения, задержки прогрессирования, лечения, уменьшения симптома или облегчения иным образом опосредованного CD71 заболевания у субъекта посредством введения терапевтически эффективного количества антитела против CD71, конъюгированного антитела против CD71, активируемого антитела против CD71 и/или конъюгированного активируемого антитела против CD71, описанного в настоящем документе, нуждающемуся в этом субъекту.

Изобретение относится также к способам предотвращения, задержки прогрессирования, лечения, уменьшения симптома или облегчения иным образом злокачественной опухоли у субъекта посредством введения терапевтически эффективного количества антитела против CD71, конъюгированного антитела против CD71, активируемого антитела против CD71 и/или конъюгированного активируемого антитела против CD71, описанного в настоящем документе, нуждающемуся в этом субъекту. Известно, что CD71 экспрессируется во множестве злокачественных опухолей, таких как, в качестве неограничивающих примеров, аденокарцинома, злокачественная опухоль желчных протоков (билиарная), рак мочевого пузыря, рак молочной железы, например, трижды отрицательный рак молочной железы и отрицательный по Her2 рак молочной железы; карциноидная злокачественная опухоль; рак шейки матки; холангиокарцинома; колоректальная; эндометриальная; глиома; рак головы и шеи, например плоскоклеточный рак головы и шеи; лейкоз; рак печени; рак легкого, например NSCLC, SCLC; лимфома; меланома; рак ротоглотки; рак яичника; рак поджелудочной железы; рак предстательной железы, например метастазирую-

шая устойчивая к кастрации карцинома предстательной железы; рак почки; рак кожи; плоскоклеточный рак, рак желудка; рак яичка; рак щитовидной железы; и уротелиальный рак.

В некоторых вариантах осуществления злокачественная опухоль ассоциирована с экспрессирующей CD71 опухолью. В некоторых вариантах осуществления злокачественная опухоль обусловлена экспрессирующей CD71 опухолью.

Антитело против CD71, конъюгированное антитело против CD71, активируемое антитело против CD71 и/или конъюгированное активируемое антитело против CD71, используемые в любом из вариантов осуществления этих способов и применений, можно вводить на любой стадии заболевания. Например, такое антитело против CD71, конъюгированное антитело против CD71, активируемое антитело против CD71 и/или конъюгированное активируемое антитело против CD71 можно вводить пациенту, страдающему злокачественной опухолью на любой стадии, от ранней до метастазирующей. Термины субъект и пациент используют взаимозаменяемо в настоящем документе.

В некоторых вариантах осуществления субъект представляет собой млекопитающего, такого как человек, нечеловекообразный примат, животное-компаньон (например, кошка, собака, лошадь), сельскохозяйственное животное, рабочее животное или животное зоопарка. В некоторых вариантах осуществления субъект представляет собой человека. В некоторых вариантах осуществления субъект представляет собой животное-компаньона. В некоторых вариантах осуществления субъект представляет собой животное под наблюдением ветеринара.

Антитело против CD71, конъюгированное антитело против CD71, активируемое антитело против CD71 и/или конъюгированное активируемое антитело против CD71 и их терапевтические составы вводят субъекту, страдающему заболеванием или нарушением или чувствительному к заболеванию или нарушению, ассоциированному с измененной экспрессией и/или активностью CD71. Субъекта, страдающего заболеванием или нарушением или чувствительного к заболеванию или нарушению, ассоциированному с измененной экспрессией и/или активностью CD71, идентифицируют с использованием любого из множества способов, известных в данной области. Например, субъектов, страдающих злокачественной опухолью или другим неопластическим состоянием, идентифицируют с использованием любого из множества клинических и/или лабораторных тестов, таких как физическое обследование и анализ крови, мочи и/или кала для оценки состояния здоровья. Например, субъектов, страдающих воспалением и/или воспалительным нарушением, идентифицируют с использованием любого из множества клинических и/или лабораторных тестов, таких как физическое обследование и/или анализ физиологической жидкости, например, анализ крови, мочи и/или кала, для оценки состояния здоровья.

Введение антитела против CD71, конъюгированного антитела против CD71, активируемого антитела против CD71 и/или конъюгированного активируемого антитела против CD71 пациенту, страдающему заболеванием или нарушением, ассоциированным с измененной экспрессией и/или активностью CD71, считают успешным, если достигают любой из множества лабораторных или клинических целей. Например, введение антитела против CD71, конъюгированного антитела против CD71, активируемого антитела против CD71 и/или конъюгированного активируемого антитела против CD71 пациенту, страдающему заболеванием или нарушением, ассоциированным с измененной экспрессией и/или активностью CD71, считают успешным, если один или несколько симптомов, ассоциированных с заболеванием или нарушением, облегчены, уменьшены, ингибированы или не прогрессируют до следующего, т.е., худшего, состояния. Введение антитела против CD71, конъюгированного антитела против CD71, активируемого антитела против CD71 и/или конъюгированного активируемого антитела против CD71 пациенту, страдающему заболеванием или нарушением, ассоциированным с измененной экспрессией и/или активностью CD71, считают успешным, если заболевание или нарушение достигает ремиссии или не прогрессирует до следующего, т.е., худшего состояния.

В некоторых вариантах осуществления антитело против CD71 конъюгированное антитело против CD71, активируемое антитело против CD71 и/или конъюгированное активируемое антитело против CD71 и их терапевтические составы вводят субъекту, страдающему заболеванием или нарушением или чувствительному к заболеванию или нарушению, такому как субъекты, страдающие злокачественной опухолью или другим неопластическим состоянием, где пораженные заболеванием клетки субъекта экспрессируют CD71. В некоторых вариантах осуществления, пораженные заболеванием клетки ассоциированы с измененной экспрессией и/или активностью CD71. В некоторых вариантах осуществления, пораженные заболеванием клетки ассоциированы с нормальной экспрессией и/или активностью CD71. Субъекта, страдающего заболеванием или нарушением, или чувствительного к заболеванию или нарушению, где пораженные заболеванием клетки субъекта, экспрессирующие CD71, идентифицируют с использованием любого из множества способов, известных в данной области. Например, субъектов, страдающих злокачественной опухолью или другим неопластическим состоянием, идентифицируют с использованием любого из множества клинических и/или лабораторных тестов, таких как физическое обследование и анализ крови, мочи и/или кала для оценки состояния здоровья. Например, субъектов, страдающих воспалением и/или воспалительным нарушением, идентифицируют с использованием любого из множества клинических и/или лабораторных тестов, таких как физическое обследование и/или анализ физиологической жидкости, например, анализ крови, мочи и/или кала, для оценки состояния здоровья.

В некоторых вариантах осуществления, антитело против CD71, конъюгированное антитело против CD71, активируемое антитело против CD71 и/или конъюгированное активируемое антитело против CD71 и их терапевтические составы вводят субъекту, страдающему заболеванием или нарушением или чувствительному к заболеванию или нарушению, ассоциированному с клетками, экспрессирующими CD71, или с присутствием, ростом, пролиферацией, метастазированием и/или активностью таких клеток, такому как субъекты, страдающие злокачественной опухолью или другим неопластическим состоянием. В некоторых вариантах осуществления, клетки ассоциированы с измененной экспрессией и/или активностью CD71. В некоторых вариантах осуществления, клетки ассоциированы с нормальной экспрессией и/или активностью CD71. Субъекта, страдающего заболеванием или нарушением или чувствительного к заболеванию или нарушению, ассоциированному с клетками, экспрессирующими CD71, идентифицируют с использованием любого из множества способов, известных в данной области. Например, субъектов, страдающих злокачественной опухолью или другим неопластическим состоянием, идентифицируют с использованием любого из множества клинических и/или лабораторных тестов, таких как физическое обследование и анализ крови, мочи и/или кала для оценки состояния здоровья. Например, субъектов, страдающих воспалением и/или воспалительным нарушением, идентифицируют с использованием любого из множества клинических и/или лабораторных тестов, таких как физическое обследование и/или анализ физиологической жидкости, например анализ крови, мочи и/или кала, для оценки состояния здоровья.

Введение антитела против CD71, конъюгированного антитела против CD71, активируемого антитела против CD71 и/или конъюгированного активируемого антитела против CD71 пациенту, страдающему заболеванием или нарушением, ассоциированным с клетками, экспрессирующими CD71, считают успешным, если достигают любой из множества лабораторных или клинических целей.

Например, введение антитела против CD71, конъюгированного антитела против CD71, активируемого антитела против CD71 и/или конъюгированного активируемого антитела против CD71 пациенту, страдающему заболеванием или нарушением, ассоциированным с клетками, экспрессирующими CD71, считают успешным, если один или несколько симптомов, ассоциированных с заболеванием или нарушением, облегчены, уменьшены, ингибированы или не прогрессируют до следующего, т.е., худшего, состояния. Введение антитела против CD71, конъюгированного антитела против CD71, активируемого антитела против CD71 и/или конъюгированного активируемого антитела против CD71 пациенту, страдающему заболеванием или нарушением, ассоциированным с клетками, экспрессирующими CD71, считают успешным, если заболевание или нарушение достигает ремиссии или не прогрессирует до следующего, т.е., худшего, состояния.

В некоторых вариантах осуществления антитело против CD71, конъюгированное антитело против CD71, активируемое антитело против CD71 и/или конъюгированное активируемое антитело против CD71 вводят во время и/или после лечения в комбинации с одним или несколькими дополнительными средствами, например, такими как химиотерапевтическое средство, противовоспалительное средство, и/или иммуносупрессивное средство. В некоторых вариантах осуществления антитело против CD71, конъюгированное антитело против CD71, активируемое антитело против CD71 и/или конъюгированное активируемое антитело против CD71 и дополнительное средство(средства) вводят одновременно. Например, антитело против CD71, конъюгированное антитело против CD71, активируемое антитело против CD71 и/или конъюгированное активируемое антитело против CD71 и дополнительное средство(средства) можно составлять в одной композиции или вводить в форме двух или более отдельных композиций. В некоторых вариантах осуществления антитело против CD71, конъюгированное антитело против CD71, активируемое антитело против CD71 и/или конъюгированное активируемое антитело против CD71 и дополнительное средство(средства) вводят последовательно.

Описание относится также к способам лечения, облегчения симптома или задержки прогрессирования нарушения или заболевания, при котором пораженные заболеванием клетки экспрессируют CD71, включающим в себя введение терапевтически эффективного количества антитела по этому описанию или конъюгированного антитела по этому описанию, или фармацевтической композиции, содержащей антитело по этому описанию, или фармацевтической композиции, содержащей конъюгированное антитело по этому описанию, нуждающемуся в этом субъекту. В некоторых вариантах осуществления нарушение или заболевание представляет собой злокачественную опухоль.

Описание относится также к способам лечения, облегчения симптома или задержки прогрессирования нарушения или заболевания, ассоциированного с клетками, экспрессирующими CD71, включающим в себя введение терапевтически эффективного количества антитела по этому описанию или конъюгированного антитела по этому описанию или фармацевтической композиции, содержащей антитело по этому описанию, или фармацевтической композиции, содержащей конъюгированное антитело по этому описанию, нуждающемуся в этом субъекту. В некоторых вариантах осуществления нарушение или заболевание, ассоциированное с клетками, экспрессирующими CD71, представляет собой злокачественную опухоль. В некоторых вариантах осуществления злокачественная опухоль представляет собой аденокарциному, злокачественную опухоль желчных протоков (билиарную), рак мочевого пузыря, рак кости, рак молочной железы, трижды отрицательный рак молочной железы, отрицательный по Her2 рак молочной

железы, карциноидную злокачественную опухоль, рак шейки матки, холангиокарциному, колоректальный рак, рак ободочной кишки, рак эндометрия, глиому, рак головы и шеи, плоскоклеточный рак головы и шеи, лейкоз, рак печени, рак легкого, немелкоклеточный рак легкого, мелкоклеточный рак легкого, лимфому, меланому, рак ротоглотки, рак яичника, рак поджелудочной железы, рак предстательной железы, метастазирующую устойчивую к кастрации карциному предстательной железы, рак почки, саркому, рак кожи, плоскоклеточный рак, рак желудка, рак яичка, рак щитовидной железы, злокачественную опухоль мочеполовой системы или уротелиальный рак. В некоторых вариантах осуществления природный лиганд представляет собой трансферрин. В некоторых вариантах осуществления экспрессия и/или активность CD71 млекопитающих является измененной. В некоторых вариантах осуществления способ включает в себя введение дополнительного средства. В некоторых вариантах осуществления дополнительное средство представляет собой лекарственное средство.

Описание относится также к способам ингибирования или уменьшения роста, пролиферации или метастазирования клеток, экспрессирующих CD71 млекопитающих, включающим в себя введение терапевтически эффективного количества антитела по этому описанию или конъюгированного антитела по этому описанию или фармацевтической композиции, содержащей антитело по этому описанию, или фармацевтической композиции, содержащей конъюгированное антитело по этому описанию, нуждающемуся в этом субъекту. В некоторых вариантах осуществления природный лиганд представляет собой трансферрин. В некоторых вариантах осуществления экспрессия и/или активность CD71 млекопитающих является измененной. В некоторых вариантах осуществления способ включает в себя введение дополнительного средства. В некоторых вариантах осуществления дополнительное средство представляет собой лекарственное средство.

Описание относится также к способам ингибирования, блокирования или предотвращения связывания природного лиганда с CD71 млекопитающих, включающим в себя введение терапевтически эффективного количества антитела по этому описанию или конъюгированного антитела по этому описанию или фармацевтической композиции, содержащей антитело по этому описанию или фармацевтической композиции, содержащей конъюгированное антитело по этому описанию, нуждающемуся в этом субъекту. В некоторых вариантах осуществления природный лиганд представляет собой трансферрин. В некоторых вариантах осуществления экспрессия и/или активность CD71 млекопитающих является измененной. В некоторых вариантах осуществления способ включает в себя введение дополнительного средства. В некоторых вариантах осуществления дополнительное средство представляет собой лекарственное средство.

Описание относится также к способам лечения, облегчения симптома или задержки прогрессирования нарушения или заболевания, при котором пораженные заболеванием клетки экспрессируют CD71, включающим в себя введение терапевтически эффективного количества активируемого антитела по этому описанию или конъюгированного активируемого антитела по этому описанию или фармацевтической композиции, содержащей активируемое антитело по этому описанию, или фармацевтической композиции, содержащей конъюгированное активируемое антитело по этому описанию, нуждающемуся в этом субъекту. В некоторых вариантах осуществления нарушение или заболевание представляет собой злокачественную опухоль.

Описание относится также к способам лечения, облегчения симптома или задержки прогрессирования нарушения или заболевания, ассоциированного с клетками, экспрессирующими CD71, включающим в себя введение терапевтически эффективного количества активируемого антитела по этому описанию или конъюгированного активируемого антитела по этому описанию, или фармацевтической композиции, содержащей активируемое антитело по этому описанию или фармацевтической композиции, содержащей конъюгированное активируемое антитело по этому описанию, нуждающемуся в этом субъекту. В некоторых вариантах осуществления нарушение или заболевание, ассоциированное с клетками, экспрессирующими CD71, представляет собой злокачественную опухоль. В некоторых вариантах осуществления злокачественная опухоль представляет собой аденокарциному, злокачественную опухоль желчных протоков (билиарную), рак мочевого пузыря, рак кости, рак молочной железы, трижды отрицательный рак молочной железы, отрицательный по Her2 рак молочной железы, карциноидную злокачественную опухоль, рак шейки матки, холангиокарциному, колоректальный рак, рак ободочной кишки, рак эндометрия, глиому, рак головы и шеи, плоскоклеточный рак головы и шеи, лейкоз, рак печени, рак легкого, немелкоклеточный рак легкого, мелкоклеточный рак легкого, лимфому, меланому, рак ротоглотки, рак яичника, рак поджелудочной железы, рак предстательной железы, метастазирующую устойчивую к кастрации карциному предстательной железы, рак почки, саркому, рак кожи, плоскоклеточный рак, рак желудка, рак яичка, рак щитовидной железы, злокачественную опухоль мочеполовой системы или уротелиальный рак. В некоторых вариантах осуществления природный лиганд представляет собой трансферрин. В некоторых вариантах осуществления экспрессия и/или активность CD71 млекопитающих является измененной. В некоторых вариантах осуществления способ включает в себя введение дополнительного средства. В некоторых вариантах осуществления дополнительное средство представляет собой лекарственное средство.

Описание относится также к способам ингибирования или уменьшения роста, пролиферации или

метастазирования клеток, экспрессирующих CD71 млекопитающих, включающим в себя введение терапевтически эффективного количества активируемого антитела по этому описанию или конъюгированного активируемого антитела по этому описанию или фармацевтической композиции, содержащей активируемое антитело по этому описанию, или фармацевтической композиции, содержащей конъюгированное активируемое антитело по этому описанию, нуждающемуся в этом субъекту. В некоторых вариантах осуществления природный лиганд представляет собой трансферрин. В некоторых вариантах осуществления экспрессия и/или активность CD71 млекопитающих является измененной. В некоторых вариантах осуществления способ включает в себя введение дополнительного средства. В некоторых вариантах осуществления дополнительное средство представляет собой лекарственное средство.

Описание относится также к способам ингибирования, блокирования или предотвращения связывания природного лиганда с CD71 млекопитающих, включающим в себя введение терапевтически эффективного количества активируемого антитела по этому описанию или конъюгированного активируемого антитела по этому описанию, или фармацевтической композиции, содержащей активируемое антитело по этому описанию или фармацевтической композиции, содержащей конъюгированное активируемое антитело по этому описанию, нуждающемуся в этом субъекту. В некоторых вариантах осуществления природный лиганд представляет собой трансферрин. В некоторых вариантах осуществления экспрессия и/или активность CD71 млекопитающих является измененной. В некоторых вариантах осуществления способ включает в себя введение дополнительного средства. В некоторых вариантах осуществления дополнительное средство представляет собой лекарственное средство.

Изобретение относится также к способам и наборам для применения активируемых антител против CD71 и/или конъюгированных активируемых антител против CD71 при множестве диагностических и/или профилактических показаний. Например, изобретение относится к способам и наборам для детекции присутствия или отсутствия расщепляющего средства и представляющей интерес мишени у субъекта или в образце посредством (i) приведения субъекта или образца в контакт с активируемым антителом против CD71, где активируемое антитело против CD71 содержит маскирующую группу (ММ), расщепляемую группу (СМ), расщепляемую посредством расщепляющего средства, и антигенсвязывающий домен или его фрагмент (АВ), специфически связывающий представляющую интерес мишень, где активируемое антитело против CD71 в нерасщепленном, неактивированном состоянии обладает следующей структурной аранжировкой от N-конца к С-концу: ММ-СМ-АВ или АВ-СМ-ММ; (a) где ММ представляет собой пептид, ингибирующий связывание АВ с CD71, и где ММ не обладает аминокислотной последовательностью природного партнера по связыванию АВ и не является модифицированной формой природного партнера по связыванию АВ; и (b) где, когда АВ находится в нерасщепленном, неактивированном состоянии, ММ мешает специфическому связыванию АВ с CD71, и когда АВ находится в расщепленном, активированном состоянии, ММ не создает помехи или конкуренцию специфическому связыванию АВ с CD71; и (ii) измерения уровня активированного активируемого антитела против CD71 у субъекта или в образце, где поддающийся детекции уровень активированного активируемого антитела против CD71 у субъекта или в образце показывает, что расщепляющее средство и CD71 присутствуют у субъекта или в образце, и где не поддающийся детекции уровень активированного активируемого антитела против CD71 у субъекта или в образце показывает, что расщепляющее средство, CD71 или как расщепляющее средство, так и CD71 отсутствуют у субъекта или в образце.

В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело против CD71 представляет собой активируемое антитело против CD71, конъюгированное с лекарственным средством. В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело против CD71 не является конъюгированным со средством. В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело против CD71 содержит поддающуюся детекции метку. В некоторых вариантах осуществления поддающаяся детекции метка расположена на АВ. В некоторых вариантах осуществления измерение уровня активируемого антитела против CD71 у субъекта или в образце осуществляют с использованием вторичного реагента, специфически связывающего активированное антитело, где реагент содержит поддающуюся детекции метку. В некоторых вариантах осуществления вторичный реагент представляет собой антитело, содержащее поддающуюся детекции метку.

В некоторых вариантах осуществления этих способов и наборов активируемое антитело против CD71 содержит поддающуюся детекции метку. В некоторых вариантах осуществления этих способов и наборов поддающаяся детекции метка включает в себя средство для визуализации, контрастирующее средство, фермент, флуоресцентную метку, хромофор, краситель, один или несколько ионов металла, или метку на основе лиганда. В некоторых вариантах осуществления этих способов и наборов, средство для визуализации содержит радиоактивный изотоп. В некоторых вариантах осуществления этих способов и наборов, радиоактивный изотоп представляет собой индий или технеций. В некоторых вариантах осуществления этих способов и наборов, контрастирующее средство содержит иод, гадолиний или оксид железа. В некоторых вариантах осуществления этих способов и наборов, фермент содержит пероксидазу хрена, щелочную фосфатазу, или β -галактозидазу. В некоторых вариантах осуществления этих способов и наборов, флуоресцентная метка содержит желтый флуоресцентный белок (YFP), голубой флуоресцентный белок (CFP), зеленый флуоресцентный белок (GFP), модифицированный красный флуоресцентный

белок (mRFP), t-димер-2 красного флуоресцентного белка (RFP tdimer2), HCRED, или производное европия. В некоторых вариантах осуществления этих способов и наборов, люминесцентная метка содержит производное N-метилакридиния. В некоторых вариантах осуществления этих способов, метка содержит метку Alexa Fluor®, такую как Alexa Fluor® 680 или Alexa Fluor® 750. В некоторых вариантах осуществления этих способов и наборов, метка на основе лиганда содержит биотин, авидин, стрептавидин или один или несколько гаптенон.

В некоторых вариантах осуществления этих способов и наборов, субъект представляет собой млекопитающего. В некоторых вариантах осуществления этих способов, субъект представляет собой человека. В некоторых вариантах осуществления субъект представляет собой не относящегося к человеку млекопитающего, такого как нечеловекообразный примат, животное-компаньона (например, кошку, собаку, лошадь), сельскохозяйственное животное, рабочее животное или животное зоопарка. В некоторых вариантах осуществления, субъект представляет собой грызуна.

В некоторых вариантах осуществления этих способов и наборов способ представляет собой способ *in vivo*. В некоторых вариантах осуществления этих способов способ представляет собой способ *in situ*. В некоторых вариантах осуществления этих способов способ представляет собой способ *ex vivo*. В некоторых вариантах осуществления этих способов способ представляет собой способ *in vitro* способ.

В некоторых вариантах осуществления способов и наборов способ используют для идентификации или, в ином случае, уточнения популяции пациентов, подходящих для лечения с использованием активируемого антитела против CD71 по этому описанию, с последующим лечением посредством введения этого активируемого антитела против CD71 и/или конъюгированного активируемого антитела против CD71 нуждающемуся в этом субъекту. Например, пациентов с положительным тестом как на мишень (например, CD71), так и на протеазу, расщепляющую субстрат в расщепляемой группе (СМ) активируемого антитела против CD71, при тестировании этими способами, идентифицируют как подходящих кандидатов для лечения с использованием такого активируемого антитела против CD71, содержащего такую СМ, и затем пациенту вводят терапевтически эффективное количество активируемого антитела против CD71 и/или конъюгированного активируемого антитела против CD71, которое тестировали. Подобным образом, пациентов с отрицательным тестом на любую или обе из мишени (например, CD71) и протеазы, расщепляющей субстрат в СМ в активируемом антителе, протестированных с использованием этих способов, можно идентифицировать как подходящих кандидатов для другой формы терапии. В некоторых вариантах осуществления таких пациентов можно тестировать с использованием других активируемых антител против CD71, пока не идентифицируют подходящее активируемое антитело против CD71 для лечения (например, активируемое антитело против CD71, содержащее СМ, расщепляемую пациентом в участке заболевания). В некоторых вариантах осуществления пациенту затем вводят терапевтически эффективное количество активируемого и/или конъюгированного антитела против CD71, для которого пациент протестирован как положительный. Пригодные АВ, ММ и/или СМ включают в себя любую из АВ, ММ и/или СМ, описанных в настоящем документе.

Фармацевтические композиции по изобретению могут содержать антитело по изобретению и носитель. Эти фармацевтические композиции можно включать в наборы, например, такие как диагностические наборы.

В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция содержит антитело по этому описанию, активируемое антитело по этому описанию, конъюгированное антитело по этому описанию и/или конъюгированное активируемое антитело по этому описанию, и носитель. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция содержит дополнительное средство. В некоторых вариантах осуществления дополнительное средство представляет собой лекарственное средство.

Краткое описание чертежей

Фиг. 1 представляет собой график, изображающий способность антител против CD71 по этому описанию связывать CD71 человека.

Фиг. 2 представляет собой график, изображающий способность различных активируемых антител против CD71 по этому описанию связывать CD71 человека.

Фиг. 3А представляет собой график, изображающий способность неконъюгированных и конъюгированных активируемых антител против CD71 по этому описанию связывать CD71 человека, когда активируемое антитело является интактным или протеолитически активированным.

Фиг. 3В представляет собой график, изображающий цитотоксичность *in vitro* конъюгированных активируемых антител против CD71 и активированных конъюгированных активируемых антител против CD71 по этому описанию.

Фиг. 4 представляет собой график, изображающий эффективность конъюгированного активируемого антитела против CD71 по этому описанию для ксенотрансплантатов опухолей NCI-H292.

Фиг. 5 представляет собой график, изображающий эффективность конъюгированного активируемого антитела против CD71 по этому описанию для ксенотрансплантатов опухолей рака молочной железы HCC1806.

Фиг. 6А представляет собой график, изображающий, что антитело против CD71 по этому описанию связывает эпителиальные клетки первичной почки яванского макака, фиг. 6В представляет собой график,

изображающий, что антитело против CD71 по этому описанию связывает CD71 яванского макака, но не связывает CD71 мыши, и фиг. 6С представляет собой график, изображающий, что мышинные и гуманизированные антитела против CD71 по этому описанию связывают линию клеток человека В×РС3.

Фиг. 7 представляет собой график, изображающий, что для однократной дозы активируемого антитела против CD71 по этому описанию показано продленное время полужизни по сравнению с исходным антителом CD71 у яванских макаков.

Фиг. 8 представляет собой график, изображающий фармакокинетику конъюгированного активируемого антитела против CD71 по этому описанию при введении яванским макакам.

Фиг. 9 представляет собой график, изображающий переносимость конъюгированного активируемого антитела против CD71 по этому описанию при введении яванским макакам.

Фиг. 10 представляет собой график, изображающий иллюстративный анализ связывания между рекомбинантным CD71 и его лигандом трансферрином.

Фиг. 11А представляет собой график, изображающий анализ конкуренции за связывание с CD71 между антителом против CD71 по настоящему описанию и трансферрином. Фиг. 11В представляет собой график, изображающий анализ связывания для связывания трансферрина с CD71, показывающий ингибирование связывания посредством антитела против CD71 по настоящему описанию.

На фиг. 12А, 12В и 12С изображены иллюстративные иммуногистохимические (ИНС) анализы для определения уровней экспрессии CD71 в различных типах тканей первичных и метастазирующих злокачественных опухолей.

На фиг. 13А, 13В и 13С изображены иллюстративные исследования эффективности активируемых конъюгированных антител против CD71 (AADC) по настоящему описанию с использованием ксенотрансплантатов опухолей неходжскинской лимфомы у мышей.

На фиг. 14А-14G изображены иллюстративные исследования переносимости конъюгированных активируемых антител против CD71 (AADC) по настоящему описанию у яванских макаков.

На фиг. 15 изображены иллюстративные уровни экспрессии CD71 в различных линиях клеток с использованием антитела против CD71 так же как исследования цитотоксичности в тех же самых линиях клеток с использованием антитела против CD71 по настоящему описанию с конъюгированным с лекарственным средством вторичным антителом.

На фиг. 16А-16D изображены иллюстративные исследования способности активируемых антител против CD71 по настоящему описанию связывать CD71 человека на различных линиях клеток человеческого происхождения.

На фиг. 17А-17D изображены иллюстративные исследования цитотоксичности конъюгатов антитела против CD71 с лекарственным средством по настоящему описанию на различных линиях клеток.

На фиг. 18 изображены иллюстративные исследования цитотоксичности различных конъюгатов активируемого антитела против CD71 с лекарственным средством по настоящему описанию на происходящей из неходжскинской лимфомы линии клеток Raji.

На фиг. 19 изображено иллюстративное исследование способности различных активируемых антител против CD71 по этому описанию связывать CD71 человека.

На фиг. 20А и 20В изображено иллюстративное исследование эффективности конъюгатов антитела против CD71 с лекарственным средством (ADC) и конъюгатов активируемого антитела против CD71 с лекарственным средством (AADC) по настоящему описанию в модели ксенотрансплантата полученной от пациента опухоли.

На фиг. 21А-21Н изображены иллюстративные исследования цитотоксичности различных конъюгатов антител против CD71 с лекарственным средством по настоящему описанию на множестве происходящей из колоректальных злокачественных опухолей линий клеток.

На фиг. 22А и 22В изображены иллюстративные исследования цитотоксичности различных конъюгатов с лекарственным средством и активируемых конъюгатов с лекарственным средством антител против CD71 по настоящему описанию на происходящей из колоректальной злокачественной опухоли линии клеток HT29.

На фиг. 23А и 23В изображены иллюстративные исследования эффективности активируемых конъюгированных антител против CD71 (AADC) по настоящему описанию с использованием ксенотрансплантатов опухолей неходжскинской лимфомы у мышей.

На фиг. 24А и 24В изображены иллюстративные исследования эффективности активируемых конъюгированных антител против CD71 (AADC) по настоящему описанию с использованием ксенотрансплантатов опухолей немелкоклеточного рака легкого (NCI-H292) у мышей.

На фиг. 25 изображены иллюстративные исследования эффективности активируемых конъюгированных антител против CD71 (AADC) по настоящему описанию с использованием ксенотрансплантатов опухолей рака поджелудочной железы (В×РС3) у мышей.

На фиг. 26А и 26В изображены иллюстративные исследования эффективности активируемых конъюгированных антител против CD71 (AADC) по настоящему описанию с использованием ксенотрансплантатов полученных от пациентов опухолей (неходжскинской лимфомы) у мышей.

На фиг. 27А и 27В изображены иллюстративные исследования эффективности активируемых конъюгированных антител против CD71 (AADC) по настоящему описанию с использованием ксенотрансплантатов полученных от пациентов опухолей у мышей.

На фиг. 28 изображено иллюстративное исследование способности различных антител и активируемых антител против CD71 по этому описанию связывать CD71 человека.

На фиг. 29А-29С изображены иллюстративные исследования способности различных активируемых антител против CD71 и конъюгатов активируемых антител против CD71 с лекарственным средством по настоящему описанию связывать CD71 человека на различных линиях клеток человеческого происхождения.

На фиг. 30А-30D изображены иллюстративные исследования способности различных активируемых антител против CD71 по настоящему описанию связывать CD71 человека *in vitro* и на различных линиях клеток человеческого происхождения.

На фиг. 31А-31J изображены иллюстративные исследования цитотоксичности различных конъюгатов активируемых антител против CD71 с лекарственным средством по настоящему описанию на различных линиях клеток, происходящих из злокачественных опухолей.

На фиг. 32А и 32В изображены иллюстративные исследования способности антител против CD71 и конъюгатов антител против CD71 с лекарственным средством по настоящему описанию связывать CD71 человека на различных линиях клеток, происходящих из мелкоклеточных злокачественных опухолей легкого человека.

На фиг. 33А и 33В изображены иллюстративные исследования антипролиферативного эффекта антител против CD71 по настоящему описанию против различных линий клеток, происходящих из злокачественных опухолей.

На фиг. 34 изображены иллюстративные исследования уровня экспрессии CD71 во множестве образцов полученных от пациентов метастазирующих злокачественных опухолей.

На фиг. 35 изображены иллюстративные исследования связывания *in vivo* антител против CD71 по настоящему описанию с опухолями в модели рака поджелудочной железы на мышах.

На фиг. 36 изображены иллюстративные исследования связывания *in vivo* антител против CD71 по настоящему описанию с опухолями в модели метастазирующего рака молочной железы на мышах.

На фиг. 37 изображены иллюстративные исследования связывания *in situ* антител против CD71 по настоящему описанию в модели ксенотрансплантата злокачественной опухоли легкого.

Подробное описание изобретения

Настоящее описание относится к моноклональным антителам (mAb) и активируемым моноклональным антителам, специфически связывающим CD71, известный также как белок рецептор трансферрина 1 (TfR1). В некоторых вариантах осуществления моноклональные антитела и активируемые моноклональные антитела интернализуются содержащими CD71 клетками. Применение термина "CD71" предназначено, чтобы охватывать любые его варианты, такие как, в качестве неограничивающего примера, CD-71 и/или CD 71, и все варианты применяются в настоящем документе взаимозаменяемо.

CD71 представляет собой трансмембранный гликопротеин, который в первую очередь связывает трансферрин. CD71 является необходимым для клеточного гомеостаза. CD71 подвергается непрерывной рециркуляции путем опосредованного лигандом эндоцитоза, где основным лигандом является трансферрин. Известно также, что CD71 повсеместно экспрессируется на делящихся клетках.

Измененная экспрессия и/или активность CD71 и связанная с CD71 передача сигналов вовлечены в патогенез многих заболеваний и нарушений, таких как злокачественные опухоли. CD71 является сверхэкспрессированным во множестве злокачественных опухолей, включая как солидные, так и гематологические злокачественные опухоли. CD71 обладает широкой экспрессией на поверхности клеток. CD71 в злокачественных клетках опосредует более высокое поглощение железа, необходимое для деления клеток. CD71 ассоциирован также с плохим прогнозом при лейкозах.

CD71 является желательной мишенью, поскольку является преобладающим среди множества показателей злокачественных опухолей.

Это описание относится к антителам против CD71, конъюгированным антителам против CD71, активируемым антителам против CD71 и/или конъюгированным активируемым антителам против CD71, которые можно использовать в способах лечения, предотвращения, задержки прогрессирования, облегчения и/или уменьшения симптома заболевания или нарушения, ассоциированного с измененной экспрессией и/или активностью CD71. Например, активируемые антитела против CD71 используют в способах лечения, предотвращения, задержки прогрессирования, облегчения и/или уменьшения симптома злокачественной опухоли или другого неопластического состояния.

Это описание относится к антителам против CD71, конъюгированным антителам против CD71, активируемым антителам против CD71 и/или конъюгированным активируемым антителам против CD71, которые можно использовать в способах лечения, предотвращения, задержки прогрессирования, облегчения и/или уменьшения симптома заболевания или нарушения, ассоциированного с клетками, экспрессирующими CD71. В некоторых вариантах осуществления клетки ассоциированы с измененной экспрессией и/или активностью CD71. В некоторых вариантах осуществления клетки ассоциированы с нормаль-

ной экспрессией и/или активностью CD71. Например, активируемые антитела против CD71 используют в способах лечения, предотвращения, задержки прогрессирования, облегчения и/или уменьшения симптома злокачественной опухоли или другого неопластического состояния.

Это описание относится к антителам против CD71, конъюгированным антителам против CD71, активируемым антителам против CD71, и/или конъюгированным активируемым антителам против CD71, которые можно использовать в способах лечения, предотвращения, задержки прогрессирования, облегчения и/или уменьшения симптома заболевания или нарушения, при которых пораженные заболеванием клетки экспрессируют CD71. В некоторых вариантах осуществления пораженные заболеванием клетки ассоциированы с измененной экспрессией и/или активностью CD71. В некоторых вариантах осуществления пораженные заболеванием клетки ассоциированы с нормальной экспрессией и/или активностью CD71. Например, активируемые антитела против CD71 используют в способах лечения, предотвращения, задержки прогрессирования, облегчения и/или уменьшения симптома злокачественной опухоли или другого неопластического состояния.

Активируемые антитела против CD71 и/или конъюгированные активируемые антитела против CD71 содержат антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, специфически связывающие CD71, присоединенные к маскирующей группе (ММ), так что присоединение ММ уменьшает способность антитела или его антигенсвязывающего фрагмента связывать CD71. В некоторых вариантах осуществления ММ присоединяют посредством последовательности, содержащей субстрат для протеазы, например, протеазы, локализованной совместно с CD71 в участке лечения у субъекта.

Иллюстративные активируемые антитела против CD71 по изобретению включают в себя, например, активируемые антитела, содержащие тяжелую цепь и легкую цепь, представляющие собой или происходящие из последовательностей варибельной области тяжелой цепи и варибельной области легкой цепи, показанных ниже (последовательности CDR показаны жирным шрифтом и подчеркнуты):

VH_muM21:

EVQLQESGTVLARPGASVKMSCKAS**GYTF****TSYWMH**WVKRPGQGLEWIG**AIY****PGNSE****ETC**
YNQNFKGAKLTAVTSASTAYMDLSSLTNEEDSAVYYCTRE**ENWDPGFAF**WGQGTLLITVSA (SEQ
ID NO: 1)

VL_muM21:

DIVMTQTPAIMSASPGKVTITCS**SASSSVYYMY**WFQOKPGTSPKLIWY**STSN****LAS**GVPV
RFSGSGSGTYSYSLTISRMEAEADAATYYC**QQRN****YPY**TFGGQTKLEIKRA (SEQ ID NO: 2)

Варибельная область тяжелой цепи hu2vHa

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKAS**GYTF****TSYWMH**WVRQAPGQGLEWMC**AIY****PGNSE****ETC**
YAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMEELSSLRSEDTAVYYCARE**ENWDPGFAF**WGQGTLLVTVSS (SEQ
ID NO: 3)

Варибельная область тяжелой цепи hu2vHb

QVQLVQSGAEVKKPGASVKMSCKAS**GYTF****TSYWMH**WVRQAPGQGLEWIG**AIY****PGNSE****ETC**
YAQKFQGRATLTADTSTSTAYMEELSSLRSEDTAVYYCTRE**ENWDPGFAF**WGQGTLLVTVSS (SEQ
ID NO: 4)

Варибельная область тяжелой цепи hu2vHc

QVQLVQSGAEVKKPGASVKMSCKAS**GYTF****TSYWMH**WVRQAPGQGLEWIG**AIY****PGNSE****ETC**
YAQKFQGRATLTADTSTSTAYMEELSSLRSEDTAVYYCTRE**ENWDPGFAF**WGQGTLLITVSS (SEQ
ID NO: 5)

Варибельная область легкой цепи hu21vKa

DIQMTQSPSSLSASVGDRTVITCS**SASSSVYYMY**WFQOKPGKAPKLLIY**STSN****LAS**GVPS
RFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC**QQRN****YPY**TFGGQTKLEIK (SEQ ID NO: 6)

Варибельная область легкой цепи hu21vKb

DIQMTQSPSSLSASVGDRTVITCS**SASSSVYYMY**WFQOKPGKAPKLIWY**STSN****LAS**GVPS
RFSGSGSGTDYTLTISMQPEDFATYYC**QQRN****YPY**TFGGQTKLEIK (SEQ ID NO: 7)

Варибельная область легкой цепи hu21vKc

DIQMTQSPSSLSASVGDRTVITCS**SASSSVYYMY**WFQOKPGKAPKLIWY**STSN****LAS**GVPS
RFSGSGSGTDYTLTISMQPEDFATYYC**QQRN****YPY**TFGGQTKLEIK (SEQ ID NO: 8)

Иллюстративные активируемые антитела против CD71 по изобретению включают в себя, например, активируемые антитела, содержащие комбинацию последовательности определяющей комплементарность области 1 варибельной области тяжелой цепи (CDR1 VH, также обозначаемой в настоящем документе как CDRH1), последовательности определяющей комплементарность области 2 варибельной области тяжелой цепи (CDR2 VH, также обозначаемой в настоящем документе как CDRH2), последовательности определяющей комплементарность области 3 варибельной области тяжелой цепи (CDR3 VH, также обозначаемой в настоящем документе как CDRH3), последовательности определяющей комплементарность области 1 варибельной области легкой цепи (CDR1 VL, также обозначаемой в настоящем документе как CDRL1), последовательности определяющей комплементарность области 2 варибельной области легкой цепи (CDR2 VL, также обозначаемой в настоящем документе как CDRL2) и последовательности определяющей комплементарность области 3 варибельной области легкой цепи (CDR3 VL, также обозначаемой в настоящем документе как CDRL3), где по меньшей мере одна последовательность

В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело против CD71 содержит комбинацию CDR из последовательности тяжелой цепи из последовательностей тяжелой цепи, показанных в группе J табл. 12. В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело против CD71 содержит комбинацию CDR из последовательности легкой цепи из последовательностей легкой цепи, показанных в группе J табл. 12. В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело против CD71 содержит комбинацию CDR из последовательности тяжелой цепи из последовательностей тяжелой цепи, показанных в группе J табл. 12 и CDR из последовательности легкой цепи из последовательностей легкой цепи, показанных в группе J табл. 12.

В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело против CD71 содержит комбинацию CDR из последовательности тяжелой цепи из последовательностей тяжелой цепи, показанных в группе K табл. 12. В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело против CD71 содержит комбинацию CDR из последовательности легкой цепи из последовательностей легкой цепи, показанных в группе K табл. 12. В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело против CD71 содержит комбинацию CDR из последовательности тяжелой цепи из последовательностей тяжелой цепи, показанных в группе K табл. 12 и CDR из последовательности легкой цепи из последовательностей легкой цепи, показанных в группе K табл. 12.

В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело против CD71 содержит комбинацию CDR из последовательности тяжелой цепи из последовательностей тяжелой цепи, показанных в группе L табл. 12. В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело против CD71 содержит комбинацию CDR из последовательности легкой цепи из последовательностей легкой цепи, показанных в группе L табл. 12. В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело против CD71 содержит комбинацию CDR из последовательности тяжелой цепи из последовательностей тяжелой цепи, показанных в группе L табл. 12 и CDR из последовательности легкой цепи из последовательностей легкой цепи, показанных в группе L табл. 12.

Таблица 12. Последовательности вариабельной области тяжелой цепи (VH) и вариабельной области легкой цепи (VL) для активируемых антител, связывающих CD71

Группа A	
VH	<u>VT</u> LVKCGPGILQPSQTLGLACTFSGISLSTSGMGLSWLRKPSGKALEWLASIWNNDNYNPSLKSRLTISKE TSNNQVFLKLTSDVTDADSTTYFCAWRERTMVTTSMLWTTGVKEPQSPS (SEQ ID NO: 425)
VL	<u>DI</u> LMTQSPASLSASVGENVTITCRASENIYSYLAWYQQKQKSPQLLLYKEKTLAEGVSSRFSGSGSGTQFS LRINSLQPEDFGSYQCQHHYGIPTWTFGGGKLEIKR (SEQ ID NO: 426)
Группа B	
VH	<u>EV</u> QLVQSGAEVKKPGASVKVCKASGYFTFSYWMHWVRQAPGQRLEWIGEINPTNGRTNYIEKFKSRATLTV DKSASTAYMELSSLRSEDVAVYICARGTRAYHYWGQGTMTVSS (SEQ ID NO: 427)
VH	<u>EV</u> QLVQSGAEVKKPGASVKVCKGSGYFTFDYAMHWVRQAPGQGLEWMGGISTYFGRNTYINQKFKGRVTMTV DTSISTAYMELSLRSDDTAVYICARGLSGNYVMDYWGQGTMTVSS (SEQ ID NO: 428)
VH	<u>EV</u> QLVQSGAEVKKPGASVKVCKASGYFTFSYWMHWVRQAPGQGLEWIGNIYPGSGSTKYDERFKSRVTITV DTSTSTAYLELSSLRSEDVAVYICRGGYDSRAWFAYWGQGTMTVSS (SEQ ID NO: 429)
VH	<u>EV</u> QLVQSGAEVKKPGASVKVCKASGYFTFSYWMHWVRQAPGQGLEWIGYISYSGTTSYNPSSLKSRVTISR DTSKNQLSLKLSVTAADTAVYICARYCYGNPATRYFDVWGQGTMTVSS (SEQ ID NO: 430)
VH	<u>EV</u> QLVQSGAEVKKPGASVKVCKASGYFTFSYWMHWVRQAPGQRLEWIGEIAPTNGRTNYIEKFKSRATLTV DKSASTAYMELSSLRSEDVAVYICARGTRAYHYWGQGTMTVSS (SEQ ID NO: 431)
VH	<u>EV</u> QLVQSGAEVKKPGASVKVCKASGYFTFSYWMHWVRQAPGQRLEWIGEINPANGRTNYIEKFKSRATLTV DKSASTAYMELSSLRSEDVAVYICARGTRAYHYWGQGTMTVSS (SEQ ID NO: 432)
VL	<u>DI</u> QMTQSPSSLSASVGDVVTITCRASDNLYSNLAWYQQKPKGKSPKLLVYD <u>ATN</u> LADGVPSRFSGSGSGTDYT LTISLQPEDFATYYCQHFEGTPTLTFGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 433)
VL	<u>DI</u> VMTQSPDSLAVSLGERATINCRASEVSDSYGNSFMHWYQQKPGQPPKLLIY <u>RAS</u> NLESVGPDRFSGSGSR TDFTLTISLQAEADVAVYICQOSNEAPPTFGQGTKLEIK (SEQ ID NO: 434)
VL	<u>DI</u> VMTQSPDSLAVSLGERATINCRARQSVSTSSYSFMHWYQQPAGQPPKLLIKYASIQESVGPDRFSGSGSG TDFTLTISLQAEADVAVYICQHTWEIPTLTFGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 435)
VL	<u>DI</u> QMTQSPSSLSASVGDVVTITCRASKSISKYLAWYQQKPKGKTNKLLYSGSTLQSGVPSRFSGSGSGTDYT LTISLQPEDFATYYCQHNIEYPTWTFGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 436)
VL	<u>DI</u> QMTQSPSSLSASVGDVVTITCRASDNLYSNLAWYQQKPKGKSPKLLVYD <u>ATN</u> LADGVPSRFSGSGSGTDYT LTISLQPEDFATYYCQHFAGTPTLTFGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 437)
Группа C	
VH	<u>EV</u> QLVESGGGLVPGGSLRLSCAASGFTFSNYGMHWIRQAPGKLEWIAMIIYDSSKMNYADTVKGRFTISR DNAKNSLYLQMSLRAEDTAVYICAVPTSHYVVDVWGQGTMTVSS (SEQ ID NO: 438)
VH	<u>EV</u> QLVQSGAEVKKPGASVKVCKASGFTFSNYGMHWIRQAPGQGLEWIAMIIYDSSKMNYADTVKGRFTITR DNSTNTLYMELSSLRSEDVAVYICAVPTSHYVVDVWGQGTMTVSS (SEQ ID NO: 440)

VH	EVQLVESGGGLVQPGNLSLTLSVCSGFTFSNYGMHWIRQAPKKGLEWIAIYYDSKMNADTVKGRFTISR DNSKNTLYLEMNSLRSEDTAMYCAVPTSHYVVDVWQGVSVTVSS (SEQ ID NO: 442)
VH	QVQLVQSGAEVKKPGSSSVKVCASGYTFNFDIHWRQAPGQGLEWMGWIYPGDGSKYNEKFKGRVTITA DEVTSTAYMELSSLRSEDTAVYICAREWAYWGQGTITVTVSS (SEQ ID NO: 443)
VH	EVQLQQSGAVLVKPGASVKLSCPASGFNIKDTYIHWVIQRPEQGLEWIGRIDPANGDTKCDPKFQVKATITA DTSSNTAYLQLSSLTSEDVAVYFCVRDYLPPYDFWQGGTTLTVSS (SEQ ID NO: 988)
VH	QSMEESSGRLVTPGTPLTLTCTVSGFSLSSYAMSWVRQAPKKGLEWIGYIWSGGSTDYASWAKGRFTISKTS TTVDLKITSPTTEDTATYFCARRYGTSYPDYGDANGFDPWGPGLTVTVSS (SEQ ID NO: 989)
VL	DIQMTQSPASLSASLEEVITITCQASQDIGNWLAWYQQKPKGKSPQLLIYGATSLADGVPSRFRSGRSQTQFS LKISRVDQVEDIGIYYCLQAYNTPWTFGGGTKLELK (SEQ ID NO: 985)
VL	DIQMTQSPASLSASLEEVITITCQASQDIGNWLAWYQQKPKGKSPQLLIYGATSLADGVPSRFRSGRSQTQFS LKISRVDQVEDIGIYYCLQAYNTPWTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO: 986)
VL	KIVMTQSPKSMSSVGERVTLMCRASESVDTYVSWYQQKPEQSPPELLIYGASNRYTGVPRDRTGSGSATDFT LTISSVQAEDLADYICGQTYNYPLTFGAGTKLELKR (SEQ ID NO: 987)
VL	AYDMTQTPASVEVAVGGTVTIKCQASQSISSYLSWYQQKPKGQRFKLLIYRASTLASGVSSRFKSGSGTQFT LTIISGVECADAAATYQCQCYSSSNVDNTFGGGTEVVVKR (SEQ ID NO: 990)
Группа D	
VH	MEWSWIFLFLLSGTAGVLSVEVLQQFGIEMVKPGASVKISCKASGYIFTDYHMDWVRQSHGKSLWIGDIDP KYDRVTYNQKFKGKASLTADKSSSTAYMELRSLTSEDVAVYCAKTGAYGDYLAYWQGGTLVTVSA (SEQ ID NO: 444)
VH	MGWSYIILFLVATATGVHSQVQLQPGAEVLKPGTSVKLSCKASGYNFTSYWINWKLKRPQGLEWIGDIYP GSGSTNYNEKFKSKATLTVDTSSSTAYMQLSSLSAEDSALYICARSAYRYDWFAYWQGGTLVTVSA (SEQ ID NO: 445)
VH	MLLGLKWFVVFVYQGVHCEVQLVESGGGLVQPKGSLKLSCAASGFTFNTYAMNWRQAPKKGLEWVARIRS KSNMYATYADSVKDRFTISRDDSQSMYLMNMLKTEDTAMYVCAYGSRNYWQGGTTLTVSS (SEQ ID NO: 446)
VH	MGWSWIFLFLLSGTAGVHSEVQLQQSGPEVVKPGASMKMSCKTSGYKFTGYMDWVKQSLGASFEWIGRVI P SNGDTRYNQKFKGKATLTVDRSSSTAYMELNSLTSEDSAVYICARKPLSGNAADYWGQGTSTVTVST (SEQ ID NO: 447)
HC	EVQLQQSGPEVVKPGASMKMSCKTSGYKFTGYMDWVKQSLGASFEWIGRVI P SNGDTRYNQKFKGKATLTVDRSSSTAYMELNSLTSEDSAVYICARKPLSGNAADYWGQGTSTVTVSTASTKGPSVFLAPSSKSTSGGTAAL GCLVKDYFPEPVTWNSGALTSQVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKK VEPKSCDKHTCTPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVHLQDNLNGKEYCKKVSNAKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDEL TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHE ALHNYHTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 448)
VL	MKLPVRLVLMFWIPASSDLVMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSLVHSDGNTFYFYLQKPGQSPKLLI YKVSNRFSGVDRFSAGGSGTYFLTKISRVEAEDLGVYFCSQTHFPPTFGGGTKLEIKR (SEQ ID NO: 449)
VL	MSVPTQVLGLLLWLTARCDIQMTQSPASLSVSVGETVTITCRASENIYSNLAWYQQKQKSPQLLVYAAT NLADGVPSRFRSGSGTQYSLKINSLSQSEDFGSIYQHFHWGTPYTFGGGTKLEIKR (SEQ ID NO: 450)

VL	MESQTQVLMSSLFLFVWSGTCGDIVMTQSPSSLTVTAGERVTMSCKSSQSLNLSGNQKNYLTWYQQKPGQPPLKLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISVQAEDLAVYYCQNDYSYPYTFGGGTKLEIKR (SEQ ID NO: 451)
VL	MTMLSLAPLLSLLLCLVSDSRAETTVTQSPASLSVATGEKVTIRCIITSTDDDDMNWYQQKPGEPKLLISDGNLTPGVPSRFSSSGYGTDFVFTIENTLSEIDTDYYCMQSDNMPFTFGSGTKLEIKR (SEQ ID NO: 452)
LC	ETTQSPASLSVATGEKVTIRCIITSTDDDDMNWYQQKPGEPKLLISDGNLTPGVPSRFSSSGYGTDFVFTIENTLSEIDTDYYCMQSDNMPFTFGSGTKLEIKRRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYSLSTLTLKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 453)
Група E	
VH	MEWSWMLFLLSGTAGVRSEVQLQQSGFELVKPGASMKISCKASGYSFTGYTMNWVKQSHGENLEWIGRINPHNGGTDYQKFKDKAPLTVDKSNTAYMELLSLTSEDSAVYYCARGYYYYLDYWGQGTSTVTVSS (SEQ ID NO: 454)
VL	MDFQVQIFSFLLISASVILSRGQIVLTQSPAIMSASPGEKVTMTCSASSSIDYIHWYQQKSGTSPKRWIYDTSKLASGVPARFSGSGSSTYSLTISSEMEPEDAATYYCHQRNSYFPTFGGGTRLEIR (SEQ ID NO: 455)
Група F	
VH	MAQVQLLESQGLVQPGGSLRLSCLAAAGFTFNTIYMAWVRQAPGKLEWVSAIKEQSGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNLSRAEDTAVYYCAAQMHHEAEVFWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO: 456)
VH	MAQVQLLESQGLVQPGGSLRLSCLAAAGFTFNTIYMAWVRQAPGKLEWVSTIKMNGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNLSRAEDTAVYYCARPMWRGNVVAENLRFWGGQGLTVTVSS (SEQ ID NO: 457)
Група G	
VH	MEFGLSWLFLVAIILKGVQCEVQLQQSGTVLARPGASVKMSCKASGYSFTIYWIHWVKQRPQGLEWIIATYIPGNSDIIYNQKFKGAKLTAVTSASTAYMELSSLTNEASAVYYCTRQGYDYAMDYWGQGTSTVTVSS (SEQ ID NO: 458)
VL	MDMRVPQQLLGLLWLPGARCDVQITQSPSYLAASPGETIIINCRASKSISKYLAWYQEKPGKTNKLLIYSGSTLQSGIPSRFSGSGSSTDFTLTISSELPQDFAMYCYCQHNEYPWTFGGGTKLEIKR (SEQ ID NO: 459)
VL	NIVMTQSPKSMMSVGERVTLTCKASENVVTVYVSWYQQKPEQSPKLLIYGASNRYTGVPDRFTGSGSATDFTLTISVQAEDLADYHCGQYSYPYTFGGGTKLEIKR (SEQ ID NO: 460)
VL	MDMRVPQQLLGLLWLPGARCDVQITQSPSYLAASPGETIIINCRASKSISKYLAWYQEKPGKTNKLLIYSGSTLQSGIPSRFSGSGSSTDFTLTISSELPQDFAMYCYCQHNEYPWTFGGGTKLEIKR (SEQ ID NO: 461)
VL	MDMRVPQQLLGLLWLPGARCDVQITQSPSYLAASPGETIIINCRASKSISKYLAWYQEKPGKTNKLLIYSGSTLQSGIPSRFSGSGSSTDFTLTISSELPQDFAMYCYCQHNEYPWTFGGGTKLQIKR (SEQ ID NO: 462)
VL	NIVMTQSPKSMMSVGERVTLTCKASENVVTVYVSWYQQKPEQSPKLLIYGASNRYTGVPDRFTGSGSATDFTLTISVQAEDLADYHCGQYSYPYTFGGGTKLQIKR (SEQ ID NO: 463)

VL	MDMRVPAQLLGLLLLWLPGARCDVQITQSPSYLAASPGETIINCRAKSIISKYLAWYQEKPGKTNKLLIYS GSTLQSGIPSRFSRSGSGTDFTLTISSELPQDFAMYCYCQHNEYPWTFGGGKTLQIKR (SEQ ID NO: 464)
Трyнна H	
VH	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSFNTYTMHWVRQAPGKGLEWVADIAVDGSKYKYYADSVKGRFTISR DNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDVAGEGYFDLWGRGTLVTVS (SEQ ID NO: 465)
VH	QVQLQQSGGGVQPGGSLRLSCAASEFTFSASGMHWVRQAPGKGLEWMAFIAYDGNOKFYADSVKGRFTISR DNSKNTLYLQMDSLRGEDTAVYYCAKEMQREGYFDYWGQGTLVTVS (SEQ ID NO: 466)
VH	QVQLAESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSYYMSWIRQAPGKGLEWVSYISTSGSSIYYVDSVKGRFTISR DNAKNSLYLQMDSLRDDTAVYYCARDLHGDIYAFDSWGQGTLVTVS (SEQ ID NO: 467)
VH	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGGGGSTYYADSVKGRFTISR DNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKYSWVSHFDYWGQGTLVTVS (SEQ ID NO: 468)
VH	QVQLVESGGGLVPEGGSLRLSCAASGFTFSNYAINWVRQAPGKGLEWVAIHHHDGNGKYYVDSVEGRFTISR DNAKNSLYLQMDSLRAEDTAVYYCARDGYGGYLDLWQGTLVTVS (SEQ ID NO: 469)
VH	QVQLQESGGGVQPGRSLRLSCAASRFTFSYAMHWVRQAPGKGLEWVAVISYDGSNKYYADSVKGRFTISR DNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDLSGYGDPDYWGQGTLVTVS (SEQ ID NO: 470)
VL	SNFMLTQDPAVSVLGGTQVTRITCQGDSLRSYYASWYQKPGQAPVLVIYGNRPSGIPDRFSGSKSGNSAS LDISGLQSEDEADYYCATWDDNLSGPIFGGGTKVTVLG (SEQ ID NO: 471)
VL	SQSALTQDPAVSVLGGTQVTRITCQGDSLRSYYASWYQQLPGTAPKLLIYRNNQRPSGVPDRFSGSKSGTSAS LAISGLRSEDEADYYCAAWDDLSAWVFGGGTKLVTVLGA (SEQ ID NO: 472)
VL	SSELTQDPAVSVLGGTQVTRITCQGDSLRSYYASWYQKPGQAPVLVIYGNRPSGIPDRFSGSKSGNSASL DISGLQSEDEADYYCATWDDNLSGPIFGGGTKVTVLG (SEQ ID NO: 473)
VL	SDVVMTQSPSTLSASVGDRTITCRASQYISNWLAWYQKPGKAPKLLIYKASSLESQVPSRFSGSGSTEF TLTISLQPEDFATYYCQESYNTPLFTFGPGTKLEIKR (SEQ ID NO: 474)
VL	SSELTQDPAVSVLGGTQVTRITCQGDSLRSYYASWYQKPGQAPVLVIYGNRPSGIPDRFSGSGSNTASL TITGAQAEDEADYYCAAWDDLSGPIFGGGTKVTVLG (SEQ ID NO: 475)
VL	SSELTQDPAVSVLGGTQVTRITCQGDSLRSYYASWYQKPGQAPVLVYGRNERPSGVPDRFSGSKSGTSASL AISGLQPEDEANYYCAGWDDSLTGPVFGGGTKLVTVLGA (SEQ ID NO: 476)
VH/ VL	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSFNTYTMHWVRQAPGKGLEWVADIAVDGSKYKYYADSVKGRFTISR DNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDVAGEGYFDLWGRGTLVTVSSGGGSGGGGSGGGSSALTQDPA VSVLGGTQVTRITCQGDSLRSYYASWYQQLPGTAPKLLIYRNNQRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSED EADYYCAAWDDLSAWVFGGGTKLVTVLGA (SEQ ID NO: 477)
VH/ VL	QVQLQQSGGGVQPGGSLRLSCAASEFTFSASGMHWVRQAPGKGLEWMAFIAYDGNOKFYADSVKGRFTISR DNSKNTLYLQMDSLRGEDTAVYYCAKEMQREGYFDYWGQGTLVTVSSGGGSGGGGSGGGSNFMLTQDPAV SVLGGTQVTRITCQGDSLRSYYASWYQKPGQAPVLVIYGNRPSGIPDRFSGSKSGNSASLDISGLQSEDE ADYYCATWDDNLSGPIFGGGTKVTVLG (SEQ ID NO: 478)
VH/ VL	QVQLAESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSYYMSWIRQAPGKGLEWVSYISTSGSSIYYVDSVKGRFTISR DNAKNSLYLQMDSLRDDTAVYYCARDLHGDIYAFDSWGQGTLVTVSSGGGSGGGGSGGGSSSELTQDPAVS VALGQTVTRITCQGDSLRSYYASWYQKPGQAPVLVIYGNRPSGIPDRFSGSKSGNSASLDISGLQSEDEA DYYCATWDDNLSGPIFGGGTKVTVLG (SEQ ID NO: 479)

VH/ VL	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGGGGSTYYADSVKGRFTISR DNSKNTLYLQMNLSRAEDTAVYYCAKVS SSWSHFDY WGQGLTVTVSSGGGGSGGGGSDVVMTQSPST LSASVGDVTRVITCRASQYISNWLAWYQQKPGKAPKLLIYKASSLES GVPSRFRS GGSGTEFTLTISSLPED FATYYCQESYNTPLFTFGPGTKLEIKR (SEQ ID NO: 480)
VH/ VL	QVQLVESGGGLVPEPGGSLRLSCAASGFTFSNYAINWVRQAPGKGLEWVANIHHDGNGKYYVDSVEGRFTISR DNAKNSLYLQMNLSRAEDTAIYYCARDG YGGYLDL WGQGLTVTVSSGGGGSGGGGSELTQDPAVSV ALGQTVRITCQ GD SLRSYYASWYQQKPGQAPVLIY GKNNRPSGI PDRFSGSGSNTASLTITGAQAEDEAD YYCAAWDDSLSGPVFGG TK TVLG (SEQ ID NO: 481)
VH/ VL	QVQLQESGGGVVQPRSLRLSCAASRFTFSYAMHWVRQAPGKGLEWVAVISYDGSNKYYADSVKGRFTISR DNSKNTLYLQMNLSRAEDTAVYYCARDLSG YGDY PDYWGQGLTVTVSSGGGGSGGGGSELTQDPAV SVALGQTVRITCQ GD SLRSYYASWYQQKPGQAPVLMVY GRNERES GV PSRFRS SGSKTSASLAISGLQPEDE ANYYCA GWDDSLT GFVFGG TK TVLG (SEQ ID NO: 482)
Група I	
VH	MEFGLSWLFLVAILKGVQCEVQLQQSGTVLARPASVKMSCKASGYSFTIYWIHWVKRPFQGLEWIATIYP GNSDIYNQKFKGKAKLTAVTASTAYMELSSLTNEASAVYICTRQGYDYAMDYWGQTSVTVSS (SEQ ID NO: 483)
VL	MDMRVPAQLLGLLLWLPGARCDVQITQSPSYLAASPGETIIINCRASKISKYLAWYQEKPGKTKLLIYS GSTLQSGIPSRFRS SGS GTDFTLTISSELPQDFAMYCYQHNEY PWT FGG TK LEIKR (SEQ ID NO: 484)
Група J	
VH	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFAHETM V VRQAPGKGLEWVSHIPVVGQDPFYADSVKGRFTISR DNSKNTLYLQMNLSRAEDTAVYYCALLPKRGPWF Y WGQGLTVTVSS (SEQ ID NO: 485)
Група K	
VH	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFAHETM V VRQAPGKGLEWVSHIPVVGQDPFYADSVKGRFTISR DNSKNTLYLQMNLSRAEDTAVYYCALLPKRGPWF Y WGQGLTVTVSS (SEQ ID NO: 485)
VH/ VL	MASYELTQPPSVSVAPGQTARITCSGDALGNKYASWYQQKPGQAPVLIYEDSKRPSGIPERFSGSNSGNTA TLTISGTQAEDEADYYC SSGDS PCRAF GG TKLTVLGGSTITSYNVYTKLSSSGEVQLVESGGGLVQPG GGSLRLSCAASGFTFSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGGGGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNLS RAEDTAVYYCARHSIYRCFFAVWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO: 487)
Група L	
VH	DVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFFPKSYGMQWVRQAPGKGLEWVAVISFDGSSRYADSVKGRFTISR DNSKNTLYLQMNLSRAEDTAVYYCARDGALWGGY YSPVDV WGQGLTVTVSS (SEQ ID NO: 999)
VH	DVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFFPKSYAMHWVRQAPGKGLEWVAVISYDGSNKYYADSVKGRFTISR DNSKNTLYLQMNLSRAEDTAVYYCARDGALWGGY YSPVDV WGQGLTVTVSS (SEQ ID NO: 1000)
VH	DVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFFPKSYAMHWVRQAPGKGLEWVAVISFDGSKYYADSVKGRFTISR DNSKNTLYLQMNLSRAEDTAVYYCARDGALWGGY YSPVDV WGQGLTVTVSS (SEQ ID NO: 1001)
VH	DVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFFPKSYAMHWVRQAPGKGLEWVAVISFDGSSRYADSVKGRFTISR DNSKNTLYLQMNLSRAEDTAVYYCARDGALWGGY YSPVDV WGQGLTVTVSS (SEQ ID NO: 1002)
VH	DVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFFPKSYGMQWVRQAPGKGLEWVAVISFDGSSRYADSVKGRFTISR DNSKNTLYLQMNLSRAEDTAVYYCARDGALWGGY YSPVDV WGQGLTVTVSS (SEQ ID NO: 1003)

VH	DVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMQWVRQAPFGKLEWVAVISFDGGSRYYADSVKGRFTISR DNSKNTLYLQMNLSRAEDTAVYYCARDGALWGGYSPVDVWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO: 1004)
VH	DVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYGMQWVRQAPFGKLEWVAVISFDGGSRYYADSVKGRFTISR DNSKNTLYLQMNLSRAEDTAVYYCARDGALWGGYSPVDVWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO: 1005)
VH	DVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMQWVRQAPFGKLEWVVISFDGGNRYADSVKGRFTISR DNSKNTLYLQMNLSRAEDTAVYYCARDGALWGGYSPVDVWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO: 1006)
VH	DVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMQWVRQAPFGKLEWVIVSFDGGNRYADSVKGRFTISR NSKNTLYLQMNLSRAEDTAVYYCARDGALWGGYSPIDVWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO: 1007)
VL	DFMLTQPHSVSESPGKTVTISCTRSSGSIASNYVQWYQQRFGSSPTTVIYEDNQRPSPGVPDRFSGSIDSSN SASLTISGLKTEDEADYYCQSYDSSNHVFGGKTLAVL (SEQ ID NO: 1008)
VL	DFMLTQPQSVSESPGKTVTISCTRSSGSIASNYVQWYQQRFGSSPTTVIYEDNQRPSPGVPDRFSGSIDSSN SASLTISGLKTEDEADYYCQSYDSSNQWVFGGKTLAVL (SEQ ID NO: 1009)
VL	QXSLTQPPSVSGSPGQSVTISCTGSSNIASXNYVSWYQXPGTAPKLMYENNKRPSPGVPDRFSGSKXSSG NTASLTISGLQAEDEADYYCQSYDSSLSX (SEQ ID NO: 1010)
VL	DSALTQPPSVSGSPGQSVTISCTGSSNIASNSVQWYQQLPGTAPKTVIYEDTQRPSPGVPDRFSGSKDSSG NTASLTISGLQAEDEADYYCQSYDSAYHWVFGGKTLAVL (SEQ ID NO: 1011)
VL	DSALTQPPSVSGSPGQSVTISCTGSSNIASNSVQWYQQLPGTAPKTVIYENTQRPSPGVPDRFSGSKDSSG NTASLTISGLQAEDEADYYCQSYDSAYHWVFGGKTLAVL (SEQ ID NO: 1012)
VL	DFMLTQPHSVSESPGKTVIISCTRS DGTIAGYVQWYQQRFGRAPTTVIFEDTQRPSPGVPDRFSGSIDRSSN SASLTISGLQTEDEADYYCQSYDRDHWVFGGKTLTVLG (SEQ ID NO: 1013)
VL	DFMLTQPHSVSESPGKTVIISCTRS DGTIAGYVQWYQQRFGRAPTTVIFEDTQRPSPGVPDRFSGSIDRSSN SASLTISGLQTEDEADYYCQSYDRDHWVFGGKTLTVL (SEQ ID NO: 1014)
VL	DFMLTQPQSVSESPGKTVIISCTRS DGTIAGYVQWYQQRFGRAPTTVIFEDTQRPSPGVPDRFSGSIDRSSN SASLTISGLQTEDEADYYCQSYDRDQWVFGGKTLTVL (SEQ ID NO: 1015)
VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRTVITCRASQSI SNYLAWYQKPKGKAPKLLIYAASSLESVPSRFSGSGSGTDFT LTISLQPEDFATYYCQYNSLPWTFGQGTKEIK (SEQ ID NO: 1016)
VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRTVITCRASQSIASNSVQWYQKPKGKAPKTVIYEDTQLESVPSRFSGSGSGTDFT LTISLQPEDFATYYCQSYDSAYHWVFGQGTKEIK (SEQ ID NO: 1017)
VL	DIQMTQSPSTLSASVGDRTVITCRASQSISSWLAWYQKPKGKAPKLLIYDASSLESVPSRFSGSGSGTEFT LTISLQPDDEFATYYCQYNSYS (SEQ ID NO: 1018)
VL	DIQMTQSPSTLSASVGDRTVITCRASQSIASNSVQWYQKPKGKAPKTVIYEDTQLESVPSRFSGSGSGTEFT LTISLQPDDEFATYYCQSYDSAYHWVFGQGTKEIK (SEQ ID NO: 1019)
VL	DIQMTQSPSTLSASVGDRTVITCRASQSIASNSVQWYQKPKGKAPKTVIYEDTQLESVPSRFSGSGSGTEFT LTISLQPDDEFATYYCQSYNSAYHWVFGQGTKEIK (SEQ ID NO: 1020)
VL	DIQMTQSPSTLSASVGDRTVITCRASQSIASNSVQWYQKPKGKAPKTVIYEDTQLESVPSRFSGSGSGTEFT LTISLQPDDEFATYYCQSYNSAYQWVFGQGTKEIK (SEQ ID NO: 1021)
VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRTVITCRASQGI RNDLTWYQKPGTAPKRLIYGATSLQSGVPSRFSGSGSGTEFT LTINSLQPEDFATYYCLQYSSFPWTFGQGTKEVK (SEQ ID NO: 1022)
VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRTVITCRASQSIASNSVQWYQKPGTAPKTVIYEDTQLESVPSRFSGSGSGTEFT LTINSLQPEDFATYYCQSYDSAYHWVFGQGTKEIK (SEQ ID NO: 1023)
VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRTVITCRASQSIASNSVQWYQKPGTAPKTVIYEDTQLESVPSRFSGSGSGTEFT LTINSLQPEDFATYYCQSYNSAYHWVFGQGTKEIK (SEQ ID NO: 1024)
VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRTVITCRASQSIASNSVQWYQKPGTAPKTVIYEDTQLESVPSRFSGSGSGTEFT LTINSLQPEDFATYYCQSYNSAYQWVFGQGTKEIK (SEQ ID NO: 1025)

(VH/VL=VH, связанная с VL)

В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело против CD71 содержит последовательность CDR, показанную в табл. 13, комбинацию последовательностей CDR VL (CDR1 VL, CDR2 VL, CDR3 VL), выбранную из группы, состоящей из этих комбинаций, показанных в одной строке табл. 13, комбинацию последовательностей CDR VH (CDR1 VH, CDR2 VH, CDR3 VH), выбранную из группы, состоящей из этих комбинаций, показанных в табл. 13, или комбинацию последовательностей CDR VL и CDR VH (CDR1 VL, CDR2 VL, CDR3 VL, CDR1 VH, CDR2 VH, CDR3 VH), выбранную из группы, состоящей из этих комбинаций, показанных в табл. 13.

Таблица 13. Последовательности CDR для антител и активируемых антител, связывающих CD71
Группа А

VH			VL		
CDR1 (SEQ ID NO)	CDR2 (SEQ ID NO)	CDR3 (SEQ ID NO)	CDR1 (SEQ ID NO)	CDR2 (SEQ ID NO)	CDR3 (SEQ ID NO)
TSGMGL (488)	ASIWNNNDNYNPSLKS (489)	AWRERTMVTTSMLWT (490)	RASENIYSYLA (491)	KEKTLAE (492)	QHHYGIPTWT (493)
	GISTYFGRNTNYNQRFKG (494)	GLSGNYVMDY (495)	RASESVDSYGN SFMH (496)	RASNLES (497)	QQSNEAPPT (500)
	VIS (F/P) YSGKTN YSQNFMG (501)	GLSGNFVDF (502)	RASESVDDYPN SFMH (503)	DATNLAD (504)	QHSNE (G/D) PPT (505)
	EINPTNGRTNYIEK FKS (506)	YGYGNPATRYF DV (507)	RASENLYSNLA (508)	DATDLAD (509)	QHFAGTPLT (510)
	EINP (I/S) NGRTN Y (N/S) E (N/T) FK K (511)	GLSGNYVMDY (495)	RASDNIYSNLA (513)	YASIQES (514)	GGYDSRAWFRGAMA Y (515)
	NIYPGSGSTKYDER FKS (516)	GLSGNYVVDY (517)	RARQSVSTSSY SFMH (518)	STS (N/R) L (A/H) S (519)	(Q/R) G (A/G) (L/Y) (Y/C) (D/Y) (C/D) (Y/G) (Y/G) (F или отсутствует) DH (520)
	(S/G) I (S/L) NGG DNTYY (P/N) D (K/T) VKG (521)	GLSGNFVDF (522)	TT (S/G) S (V/D) (P/I) (S/T) NY (F/L) N (523)		QQSNEAPPT (524)
	VISPYSGRTNYNQN FKG (525)	GTRAYHY (526)			QQSNEGPPT (527)
	EIAPTNGRTNYIEK FKS (528)	GTRAYHF (529)			GISTYFGRNTNYNQR FK (530)
	VISFYSGKTNYNQR FMG (531)	GTRAYHY (526)			QHSNEDPPT (533)
	VISPYSGKTNYSQK FKG (534)	GTRAYHF (529)			QHFAGTPLT (510)
	EINPTNGRTNYIEK FK (537)	GGYDSRAWFAY (538)			QHFAGTPLM (539)
	EINPTNGRTNYNEN FKS (540)	GGYDSRAWFAH (541)			QQHNEYPTWT (542)
	EINPTNGRTNYSEK FKK (543)	QGALYDGYVRG AMDY (544)			QHTWEIPPT (545)
	YISYSGTTSYNPNSLKS (546)	RGYGYDGEFAY (547)			HQYHRSPPT (548)
	NIYPGSGSTKYDER FKS (516)				QQANTLPYT (550)
	NIYPGSGSTKYDEK FKS (551)				QHTWEIPPT (552)
	SISNGGDNTYYPDV VK (553)				HQ (Y/A) (H/N) (R/T) (S/L) PYT (554)
	EILPQSGSTKYNEK FKG (555)				QQSNEAPPT (556)
					QHFAGTPLT (557)

Группа В

VH			VL		
CDR1 (SEQ ID NO)	CDR2 (SEQ ID NO)	CDR3 (SEQ ID NO)	CDR1 (SEQ ID NO)	CDR2 (SEQ ID NO)	CDR3 (SEQ ID NO)
GFTFSNYGMH (558)	MIYYDSSKMNADTVKNG (559)	PTSHYVVDV (560)			
GFTFSNYGMH (561)	MIYYDSSKMNADTVKNG (559)	PTSHYVVDV (563)			
GYTFTNYDIH (564)	MIYYDSSKMNADTVKNG (559)	PTSHYVVDV (566)			
	WIYPGDGSKYNEKFKG (567)	YWGQGTTV (578)			

Группа С

VH			VL		
CDR1 (SEQ ID NO)	CDR2 (SEQ ID NO)	CDR3 (SEQ ID NO)	CDR1 (SEQ ID NO)	CDR2 (SEQ ID NO)	CDR3 (SEQ ID NO)
TYTMH (579)	DIAYDGGSTKYK ADSVKG (580)	DAVAGEGYFDL (581)	QGDSLRSYYAS (582)	RNNQRPS (583)	AAWDDSLSAWV (584)
ASGMH (585)	FIAYDGNQKIFY ADSVKG (586)	EMQREGYFDY (587)	QGDSLRSYYAS (582)	GKNNRPS (589)	ATWDDNLSGPI (590)
DYYMS (591)	YISTSGSSIIYVDSVKG (592)	DLIGDYAFDS (593)	QGDSLRSYYAS (582)	GKNNRPS (589)	ATWDDNLSGPI (590)
SYAMS (597)	AISGSGGTYK ADSVKG (598)	VSSSWSHFDY (599)	RASQYISNWL (600)	KASSLES (601)	QESYNTPLFT (602)
NYAIN (603)	NIHHDGNGKYYVDSVEG (604)	DGYGGYLDL (605)	QGDSLRSYYAS (582)	GKNNRPS (589)	AAWDDSLSGPV (608)
SYAMH (609)	VISYDGSNKYY ADSVKG (610)	DLSGYGDYDPY (611)	QGDSLRSYYAS (582)	GRNERPS (613)	AGWDDSLTGPV (614)

Группа D

VH			VL		
CDR1 (SEQ ID NO)	CDR2 (SEQ ID NO)	CDR3 (SEQ ID NO)	CDR1 (SEQ ID NO)	CDR2 (SEQ ID NO)	CDR3 (SEQ ID NO)
Любая из комбинаций CDR VH, показанных в абзацах [0060], [00150] и/или [00151] из Публикации патентной заявки США No. 2014/0114054			Любая из комбинаций VL CDR, показанных в абзацах [0060], [00150] и/или [00151] из Публикации патентной заявки No. 2014/0114054		
TSGVGVG (439)	LIYWDDDKHYS PSLKS (441)	NGDYGIEFDY (486)	GGNNIGSKSVH (512)	YDSDRPS (516)	QVWSSSDHVV (532)
SYSMN (535)	SISSSSSYIYY ADSVKG (536)	ARESVDAFDI (562)	QGDSLRSYDAS (565)	GLSDRPS (588)	ISRDSGGNPH (594)
SYAMS (597)	AISGSGGSTYY ADSVKG (598)	GYGNSYYGMD V (595)	SGSSSNIQSNY VY (596)	RNNQRPS (583)	AAWDDSLSGPV (608)
DFVFS (606)	WISAHDGWNTY AQLQD (607)	DTFTNLLGDYSY DAMDV (612)	SSSTGAVTSGH YPY (909)	DTTEKHS (910)	LLSSGDGRAV (911)
NYGMS (912)	WISAYNGWNTY GEKLLQ (913)	DDYYSGVDAFD I (914)	GGNKIGSKSVH (915)	YDRDRPS (916)	QVWSSSDHVV (917)
SYGMH (918)	VISFDGSSKYY ADSVKG (919)	DSNFWSGYYSFV DV (920)	TRSSGSIASNS VQ (921)	YEDTQRPS (922)	QSYDSAYHWV (923)
SYWLS (924)	KIDPDSYTYQY SPSFEG (925)	HGYDAFHV (926)	SGSSSNIQSNNV (927)	YDDLPS (928)	AAWDDSLNGWV (929)
DYAMH (930)	GISWNSGSIY ADSVKG (931)	DQHREFYYGMD V (932)	SGSSSNIQSNNV VY (936)	RNNQRPS (583)	AAWDDSLSGPV (608)
SYWIG (933)	IYFPGDSYTYQY SPSFEG (934)	QGTNMGVDAFD I (935)	GGNNIGSKSVH (512)	DDSDRPS (936)	QVWDDISDHVV (937)
SYAMS (597)	AISGSGGSTYY ADSVKG (598)	DRYYYGSGSYD AFDI (938)	QGDSLRSYDAS (582)	GKNNRPS (589)	NSRDSGGNPHV (939)
SYSMN (535)	VISYDGSNKYY ADSVKG (610)	VDPGDRGWYFDL (940)	SGSSSNIQSNT VN (941)	SNNQRPS (942)	AAWDDSLNGWV (929)
SSPYIYG (943)	SVYYSNGTYNN PSLTR (944)	HSWGINDAFDV (945)	SGSSSNIQSNNV VS (946)	DNNKRPS (947)	GTWSSSLVWV (948)
DYAMH (930)	GISWNSGSIY ADSVKG (949)	ENLAVAGLDY (950)	QGDSLRSYDAS (951)	DKNTRPS (952)	QSRDMSGEMV (953)
ELSMH (954)	GFPDPEGETIY AQLKQ (955)	DAYYGGSPRDA FDI (956)	GGDNVGGKSLH (957)	DDRDRPS (958)	QVWDDISRLVI (959)
SYIYH (960)	IINPRGGTDF AQLKQ (961)	GDCYNGVCYSGG LDV (962)	SGSSSNIQSNNV VS (946)	DNDKRPS (963)	GTWDDNSLSGV (964)
DYAMH (930)	GISWNSGSIY ADSVKG (931)	DVDLWFGYYFD Y (965)	SGSSSNIQSNNV VS (946)	DNNKRPS (947)	GTWSSSLSAPIV (966)
DYAMY (967)	GINWNSAIIGY ADSVKG (968)	EALYSAFFDS (969)	SGSSSNIQSNNV VS (946)	DNNKRPS (947)	GTWSSSLSAWV (970)
DYAMH (930)	GINWNGGSDTY ADSVEG (971)	DYADLGSYSDY (972)	SGSSSNIQSNNV VH (973)	RNDQRPS (974)	ASWDDKMSGRL (975)
SYEMN (976)	YISSSGSTIYY ADSVKG (977)	HSNYDILTYST DAFDI (978)	TGTSDDIGFYD SVS (979)	DVSNRPS (980)	TSNTKTNLYV (981)
RGNYWWT (982)	SVHYSSTNYN PSLKS (983)	DSYVGDYIYFDY (984)	QGDSLRSYDAS (582)	GKNNRPS (589)	NSRDSGGNPHV (939)

Группа E

VH			VL		
CDR1 (SEQ ID NO)	CDR2 (SEQ ID NO)	CDR3 (SEQ ID NO)	CDR1 (SEQ ID NO)	CDR2 (SEQ ID NO)	CDR3 (SEQ ID NO)
SYGMH (918)	VISFDGSSKYY ADSVK (919)	DGNFWSGYYSFV DV (1026)	TRSSGSIASNS VQ (921)	YEDTQRPS (922)	QSYDSAYHWV (923)
SYGMH (918)	VISFDGSSKYY ADSVK (919)	DSAFWSGYYSFV DV (991)			
SYGMH (918)	VISFDGSSKYY ADSVK (919)	DSNLWWSGYYSFV DV (992)			
SYGMH (918)	VISFDGSSKYY ADSVK (919)	DSNFWGGYYSFV DV (993)			
SYGMH (918)	VISFDGSSKYY ADSVK (919)	DSALWGGYYSFV DV (994)			
SYGMH (918)	VISFDGSSKYY ADSVK (919)	DGNLWGGYYSFV DV (995)			
SYGMH (918)	VISFDGSSKYY ADSVK (919)	DGAFWGGYYSFV DV (996)			
SYGMH (918)	VISFDGSSKYY ADSVK (919)	DGALWWSGYYSFV DV (997)			
SYGMH (918)	VISFDGSSKYY ADSVK (919)	DGALWGGYYSFV DV (998)			
SYGMH (918)	VISYDGSNKYY ADSVK (1027)	DSNFWSGYYSFV DV (920)			
SYGMH (918)	VISYDGSNKYY ADSVK (610)	DSNFWSGYYSFV DV (920)			

Группа F

VH			VL		
CDR1 (SEQ ID NO)	CDR2 (SEQ ID NO)	CDR3 (SEQ ID NO)	CDR1 (SEQ ID NO)	CDR2 (SEQ ID NO)	CDR3 (SEQ ID NO)
FSLSSY (1028)	WS	GTSYYPDYGANG FD (1029)	QSISY (1030)	RAS (1031)	CYSSSNVDN (1032)
GFNIKDT (1033)	ANG	YLYPYIYFD (1034)	SESVDY (1035)	GAS	TNYNPL (1036)

В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело против CD71 содержит антитело

или происходит из антитела, изготовленного, секретированного или иным образом продуцированного посредством гибридомы, например, такой как гибридома(гибридомы), обозначенная BA120, как описано в Патенте США № 7736647, и депонированная в Collection Nationale de Cultures de Microorganismes (CNCM) (Institut Pasteur, Paris, France, 25, Rue du Docteur Roux, F-75724, Paris, Cedex 15) 14 июня 2005 г., под номером CNCM I-3449; гибридома(гибридомы), описанная в Патенте США № 7572895 и депонированная в АТСС под номером РТА-6055; гибридома(гибридомы), описанная в Публикации РСТ № WO 2014/020140 и WO 2005/111082 и депонированная в CNCM 10 мая 2001 г., под номером 1-2665; гибридома(гибридомы), описанная в Патенте США № 4434156 и депонированная в АТСС под номером НВ-8094; гибридома(гибридомы), описанная в Патенте США № 5648469 и депонированная в АТСС под номером НВ-11011 и НВ-11010.

Антитела против CD71 и АВ в активируемых антителах по этому описанию специфически связывают мишень CD71, например, такую как CD71 млекопитающих и/или CD71 человека. В это описание включены также антитела и АВ против CD71, связывающие тот же эпитоп CD71, что и антитело по этому описанию и/или активируемое активируемое антитело, описанное в настоящем документе. В это описание включены также антитела и АВ против CD71, конкурирующие с антителом против CD71 и/или активированным активируемым антителом против CD71, описанным в настоящем документе, за связывание с мишенью CD71, например, CD71 человека. В это описание включены также антитела и АВ против CD71, проявляющие перекрестную конкуренцию с антителом против CD71 и/или активированным активируемым антителом против CD71, описанным в настоящем документе, за связывание с мишенью CD71, например, CD71 человека.

Активируемые антитела против CD71, представленные в настоящем документе, содержат маскирующую группу. В некоторых вариантах осуществления, маскирующая группа представляет собой аминокислотную последовательность, присоединенную или иным образом прикрепленную к антителу против CD71 и расположенную внутри конструкции активируемого антитела против CD71, так что маскирующая группа уменьшает способность антитела против CD71 специфически связывать CD71. Пригодные маскирующие группы идентифицируют с использованием любого из множества известных способов. Например, пептидные маскирующие группы идентифицируют с использованием способов, описанных в Публикации РСТ № WO 2009/025846 от Daugherty et al., полное содержание которой приведено в настоящем документе в качестве ссылки.

Активируемые антитела против CD71, представленные в настоящем документе, содержат расщепляемую группу. В некоторых вариантах осуществления, расщепляемая группа содержит аминокислотную последовательность, являющуюся субстратом для протеазы, как правило, внеклеточной протеазы. Пригодные субстраты идентифицируют с использованием любого из множества известных способов. Например, пептидные субстраты идентифицируют с использованием способов, описанных в Патенте США № 7666817 от Daugherty et al.; в Патенте США № 8563269 от Stagliano et al. и в Публикации РСТ № WO 2014/026136 от La Porte et al., полное содержание каждого из которых, таким образом, приведено в качестве ссылки. (См. также Boulware et al. "Evolutionary optimization of peptide substrates for proteases that exhibit rapid hydrolysis kinetics". *Biotechnol Bioeng.* 106.3 (2010): 339-46).

Иллюстративные субстраты включают в себя, но без ограничения, субстраты, расщепляемые посредством одного или нескольких из следующих ферментов или протеаз, перечисленных в табл. 4.

Таблица 4. Иллюстративные протеазы и/или ферменты

ADAMS, ADAMTS, например	Цистеиновые протеазы, например, Крузипаин	Сериновые протеазы, например, Активированный белок С
ADAM8	Легумаин	Катепсин А
ADAM9	Отубаин-2	Катепсин G
ADAM10		Химаза
ADAM12		протеазы - факторы свертывания крови (например, FVIIa, FXIa, FXa, FXIIa)
ADAM15	KLK, например,	Эластаза
ADAM17/TACE	KLK4	Гранзим В
ADAMDEC1	KLK5	Гуанидинобензоатаза
ADAMTS1	KLK6	HtrA1
ADAMTS4	KLK7	Эластаза нейтрофилов человека
ADAMTS5	KLK8	Лактоферрин
	KLK10	Марапсин
Аспаргатные протеазы, например, BACE	KLK11	NS3/4A
Ранин	KLK13	РАСЕ4
	KLK14	Плазмин
Аспаргатные катепсины, например, Катепсин D Катепсин E	Металлопротеазы, например, Меприн Неприлизин	PSA
	PSMA	сРА
Каспазы, например, Каспаза 1	BMP-1	тромбин
Каспаза 2	ММР, например,	Триптаза
Каспаза 3	ММР1	сРА
Каспаза 4	ММР2	Трансмембранные сериновые протеазы типа II (ТТSP), например,
Каспаза 5	ММР3	DES1
Каспаза 6	ММР7	PPP-4
Каспаза 7	ММР8	

Каспаза 8	MMP9	FAP
Каспаза 9	MMP10	Гепсин
Каспаза 10	MMP11	Матриптаза-2
Каспаза 14	MMP12	MT-SPL/Матриптаза
	MMP13	TMPS2
Цистеиновые катепсины, например,	MMP14	TMPS3
Катепсин В	MMP15	TMPS4
Катепсин С	MMP16	
Катепсин К	MMP17	
Катепсин L	MMP19	
Катепсин S	MMP20	
Катепсин V/L2	MMP23	
Катепсин X/Z/F	MMP24	
	MMP26	
	MMP27	

Активируемые антитела против CD71, описанные в настоящем документе, преодолевают ограничения лекарственных средств на основе антител, в частности лекарственных средств на основе антител, как известно, токсичных *in vivo*, по меньшей мере до некоторой степени. Опосредованная мишенью токсичность составляет основное ограничение для разработки терапевтических антител. Активируемые антитела против CD71, представленные в настоящем документе, разработаны для борьбы с токсичностью, ассоциированной с ингибированием мишени в нормальных тканях посредством традиционных терапевтических антител. Эти активируемые антитела против CD71 остаются замаскированными до протеолитической активации в участке заболевания. Начиная с антитела против CD71 в качестве исходного терапевтического антитела, активируемые антитела против CD71 по изобретению конструировали посредством присоединения антитела к ингибирующей маске посредством линкера, содержащего субстрат для протеазы.

Когда АВ модифицировано с использованием ММ и находится в присутствии мишени, специфическое связывание АВ с его мишенью уменьшено или ингибировано, по сравнению со специфическим связыванием АВ, не модифицированного с использованием ММ, или специфическим связыванием исходного АВ с мишенью.

K_d АВ, модифицированного с использованием ММ, по отношению к мишени по меньшей мере в 5, 10, 25, 50, 100, 250, 500, 1000, 2500, 5000, 10000, 50000, 100000, 500000, 1000000, 5000000, 10000000, 50000000 или более, или в промежутке между 5-10, 10-100, 10-1,000, 10-10,000, 10-100,000, 10-1000000, 10-10000000, 100-1000, 100-10000, 100-100000, 100-1000000, 100-10000000, 1000-10000, 1000-100000, 1000-1000000, 1000-10000000, 10000-100000, 10000-1000000, 10000-10000000, 100000-10000000 или 100000-10000000 раз превышает K_d АВ, не модифицированного с использованием ММ, или исходного АВ по отношению к мишени. Напротив, аффинность связывания АВ, модифицированного с использованием ММ, по отношению к мишени, по меньшей мере в 2, 3, 4, 5, 10, 25, 50, 100, 250, 500, 1000, 2500, 5000, 10000, 50000, 100000, 500000, 1000000, 5000000, 10000000, 50000000 или более, или в промежутке между 5-10, 10-100, 10-1000, 10-10000, 10-100000, 10-1000000, 10-10000000, 100-1000, 100-10000, 100-100000, 100-1000000, 1000-10000, 1000-100000, 1000-1000000, 1000-10000000, 10000-100000, 10000-1000000, 10000-10000000 или 10000 0-10000000 раз ниже, чем аффинность связывания АВ, не модифицированного с использованием ММ, или исходного АВ по отношению к мишени.

Константа диссоциации (K_d) ММ по отношению к АВ, как правило, превышает K_d АВ по отношению к мишени. K_d ММ по отношению к АВ может по меньшей мере в 5, 10, 25, 50, 100, 250, 500, 1000, 2500, 5000, 10000, 100000, 1000000 или даже в 10000000 превышать K_d для АВ по отношению к мишени. Напротив, аффинность связывания ММ по отношению к АВ, как правило, ниже чем аффинность связывания АВ по отношению к мишени. Аффинность связывания ММ по отношению к АВ может быть по меньшей мере в 5, 10, 25, 50, 100, 250, 500, 1000, 2500, 5000, 10000, 100000, 1000000 или даже в 10000000 раз ниже, чем аффинность связывания АВ по отношению к мишени.

В некоторых вариантах осуществления константа диссоциации (K_d) ММ по отношению к АВ является приблизительно равной K_d АВ по отношению к мишени. В некоторых вариантах осуществления, константа диссоциации (K_d) ММ по отношению к АВ не превышает константу диссоциации АВ по отношению к мишени.

В некоторых вариантах осуществления константа диссоциации (K_d) ММ по отношению к АВ меньше, чем константа диссоциации АВ по отношению к мишени.

В некоторых вариантах осуществления константа диссоциации (K_d) ММ по отношению к АВ больше, чем константа диссоциации АВ по отношению к мишени.

В некоторых вариантах осуществления ММ обладает K_d для связывания с АВ, не превышающей K_d для связывания АВ с мишенью.

В некоторых вариантах осуществления ММ обладает K_d для связывания с АВ, не меньшей, чем K_d для связывания АВ с мишенью.

В некоторых вариантах осуществления ММ обладает K_d для связывания с АВ, приблизительно равной K_d для связывания АВ с мишенью.

В некоторых вариантах осуществления ММ обладает K_d для связывания с АВ, меньшей, чем K_d для связывания АВ с мишенью.

В некоторых вариантах осуществления ММ обладает K_d для связывания с АВ, превышающей K_d

для связывания АВ с мишенью.

В некоторых вариантах осуществления ММ обладает K_d для связывания с АВ, не более, чем в 2, 3, 4, 5, 10, 25, 50, 100, 250, 500 или 1000 раз превышающей K_d для связывания АВ с мишенью. В некоторых вариантах осуществления ММ обладает K_d для связывания с АВ, в промежутке между 1-5, 2-5, 2-10, 5-10, 5-20, 5-50, 5-100, 10-100, 10-1,000, 20-100, 20-1000 или 100-1000 раз превышающей K_d для связывания АВ с мишенью.

В некоторых вариантах осуществления ММ обладает аффинностью для связывания с АВ, меньшей, чем аффинность связывания АВ с мишенью.

В некоторых вариантах осуществления ММ обладает аффинностью для связывания с АВ, не превышающей аффинность связывания АВ с мишенью.

В некоторых вариантах осуществления ММ обладает аффинностью для связывания с АВ, приблизительно равной аффинности связывания АВ с мишенью.

В некоторых вариантах осуществления ММ обладает аффинностью для связывания с АВ, не меньшей, чем аффинность связывания АВ с мишенью.

В некоторых вариантах осуществления ММ обладает аффинностью для связывания с АВ, превышающей аффинность связывания АВ с мишенью.

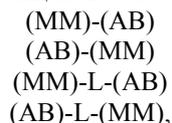
В некоторых вариантах осуществления ММ обладает аффинностью для связывания с АВ, в 2, 3, 4, 5, 10, 25, 50, 100, 250, 500 или 1000 меньшей, чем аффинность связывания АВ с мишенью. В некоторых вариантах осуществления ММ обладает аффинностью для связывания с АВ, в промежутке между 1-5, 2-5, 2-10, 5-10, 5-20, 5-50, 5-100, 10-100, 10-1000, 20-100, 20-1000 или 100-1000 раз меньшей, чем аффинность связывания АВ с мишенью. В некоторых вариантах осуществления ММ обладает аффинностью для связывания с АВ, в 2-20 раз меньшей, чем аффинность связывания АВ с мишенью. В некоторых вариантах осуществления ММ не является ковалентно связанной с АВ, и при эквимоларной концентрации с АВ не ингибирует связывание АВ с мишенью.

Когда АВ является модифицированным с использованием ММ и находится в присутствии мишени, специфическое связывание АВ с его мишенью уменьшено или ингибировано, по сравнению со специфическим связыванием АВ, не модифицированного с использованием ММ, или специфическим связыванием исходного АВ с мишенью. По сравнению со связыванием АВ, не модифицированного с использованием ММ, или связыванием исходного АВ с мишенью, способность АВ связывать мишень при модификации с использованием ММ можно уменьшать по меньшей мере на 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% и даже 100% в течение по меньшей мере 2, 4, 6, 8, 12, 28, 24, 30, 36, 48, 60, 72, 84 или 96 ч, или 5, 10, 15, 30, 45, 60, 90, 120, 150 или 180 суток, или 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 или 12 месяцев или более при измерении *in vivo* или в анализе *in vitro*.

ММ ингибирует связывание АВ с мишенью. ММ связывает антигенсвязывающий домен АВ и ингибирует связывание АВ с мишенью. ММ может стерически ингибировать связывание АВ с мишенью. ММ может аллостерически ингибировать связывание АВ с его мишенью. В этих вариантах осуществления когда АВ является модифицированным или связанным с ММ и находится в присутствии мишени, отсутствует связывание или в основном отсутствует связывание АВ с мишенью, или присутствует не более 0,001%, 0,01%, 0,1%, 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40% или 50% связывания АВ с мишенью, по сравнению со связыванием АВ, не модифицированного с использованием ММ, исходного АВ или АВ, не связанного с ММ, с мишенью, в течение по меньшей мере 2, 4, 6, 8, 12, 28, 24, 30, 36, 48, 60, 72, 84 или 96 часов, или 5, 10, 15, 30, 45, 60, 90, 120, 150 или 180 суток, или 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 или 12 месяцев или дольше при измерении *in vivo* или в анализе *in vitro*.

Когда АВ является связанным с ММ или модифицированным посредством ММ, ММ "маскирует" или уменьшает, или иным образом ингибирует специфическое связывание АВ с мишенью. Когда АВ является связанным с ММ или модифицированным посредством ММ, такое связывание или модификация может вызывать структурное изменение, уменьшающее или ингибирующее способность АВ специфически связывать его мишень.

АВ, связанный с ММ или модифицированный посредством ММ, можно представлять посредством следующих формул (в порядке от amino(N)-концевой области до карбокси(C)-концевой области:



где ММ представляет собой маскирующую группу, АВ представляет собой антитело или его фрагмент антитела, и L представляет собой линкер. Во многих вариантах осуществления может являться желательным вводить один или несколько линкеров, например, гибких линкеров, в состав для обеспечения гибкости.

В конкретных вариантах осуществления ММ не является природным партнером по связыванию АВ. В некоторых вариантах осуществления, ММ не обладает или в основном не обладает гомологией ни с каким природным партнером по связыванию АВ. В некоторых вариантах осуществления ММ является не более чем на 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75% или 80%

сходной с любым природным партнером по связыванию АВ. В некоторых вариантах осуществления ММ является не более, чем на 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, или 80% идентичной любому природному партнеру по связыванию АВ. В некоторых вариантах осуществления, ММ является не более, чем на 25% идентичной любому природному партнеру по связыванию АВ. В некоторых вариантах осуществления ММ является не более, чем на 50% идентичной любому природному партнеру по связыванию АВ. В некоторых вариантах осуществления, ММ является не более, чем на 20% идентичной любому природному партнеру по связыванию АВ. В некоторых вариантах осуществления ММ является не более, чем на 10% идентичной любому природному партнеру по связыванию АВ.

В некоторых вариантах осуществления активируемые антитела содержат АВ, модифицированный посредством ММ, а также содержат одну или несколько расщепляемых групп (СМ). Такие активируемые антитела обладают активируемым/переключаемым связыванием с мишенью АВ. Активируемые антитела, как правило, содержат антитело или фрагмент антитела (АВ), модифицированные посредством маскирующей группы (ММ) или связанные с ней, и поддающиеся модификации или расщепляемую группу (СМ). В некоторых вариантах осуществления, СМ содержит аминокислотную последовательность, служащую субстратом по меньшей мере для одной протеазы.

Элементы активируемых антител аранжированы так, что ММ и СМ расположены таким образом, что в расщепленном (или относительно активном) состоянии и в присутствии мишени, АВ связывает мишень, в то же время, когда активируемое антитело находится в нерасщепленном (или относительно неактивном) состоянии в присутствии мишени, специфическое связывание АВ с его мишенью уменьшено или ингибировано. Специфическое связывание АВ с его мишенью можно уменьшать благодаря ингибированию или маскировке посредством ММ способности АВ специфически связывать его мишень.

K_d АВ, модифицированного с использованием ММ и СМ, по отношению к мишени по меньшей мере в 5, 10, 25, 50, 100, 250, 500, 1000, 2500, 5000, 10000, 50000, 100000, 500000, 1000000, 5000000, 10000000 или более или в промежутке между 5-10, 10-100, 10-1000, 10-10000, 10-100000, 10-1000000, 10-10000000, 100-1000, 100-10000, 100-100000, 100-1000000, 100-10000000, 1000-10000, 1000-100000, 1000-1000000, 1000-10000000, 10000-100000, 10000-1000000, 10000-10000000, 100000-10000000 или 100000-10000000 раз превышает K_d АВ, не модифицированного с использованием ММ и СМ, или исходного АВ по отношению к мишени. Напротив, аффинность связывания АВ, модифицированного с использованием ММ и СМ, по отношению к мишени по меньшей мере в 5, 10, 25, 50, 100, 250, 500, 1000, 2500, 5000, 10000, 50000, 100000, 500000, 1000000, 5000000, 10000000, 50000000 или более, или в промежутке между 5-10, 10-100, 10-1000, 10-10000, 10-100000, 10-1000000, 10-10000000, 100-1000, 100-10000, 100-100000, 100-1000000, 1000-10000, 1000-100000, 1000-1000000, 1000-10000000, 10000-100000, 10000-1000000, 10000-10000000 или 10000-10000000 раз ниже, чем аффинность связывания АВ, не модифицированного с использованием ММ и СМ, или исходного АВ по отношению к мишени.

Когда АВ является модифицированным с использованием ММ и СМ, и находится в присутствии мишени, но не в присутствии модифицирующего средства (например, по меньшей мере одной протеазы), специфическое связывание АВ с его мишенью уменьшено или ингибировано, по сравнению со специфическим связыванием АВ, не модифицированного с использованием ММ и СМ, или исходного АВ с мишенью. По сравнению со связыванием исходного АВ или со связыванием АВ, не модифицированного с использованием ММ и СМ, с его мишенью, способность АВ связывать мишень при модификации с использованием ММ и СМ можно уменьшать по меньшей мере на 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% и даже 100% в течение по меньшей мере 2, 4, 6, 8, 12, 28, 24, 30, 36, 48, 60, 72, 84 или 96 ч или 5, 10, 15, 30, 45, 60, 90, 120, 150 или 180 суток, или 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 или 12 месяцев или дольше при измерении *in vivo* или в анализе *in vitro*.

Как применяют в настоящем документе, термин расщепленное состояние относится к состоянию активируемых антител после модификации СМ посредством по меньшей мере одной протеазы. Термин нерасщепленное состояние, как применяют в настоящем документе, относится к состоянию активируемых антител в отсутствие расщепления СМ посредством протеазы. Как обсуждают выше, термин "активируемые антитела" применяют в настоящем документе для обозначения активируемого антитела в его нерасщепленном (природном) состоянии, так же как в его расщепленном состоянии. Специалисту в данной области очевидно, что в некоторых вариантах осуществления в расщепленном активируемом антителе может отсутствовать ММ из-за расщепления СМ протеазой, приводящего к высвобождению по меньшей мере одной ММ (например, где ММ не является присоединенной к активируемым антителам посредством ковалентной связи (например, дисульфидной связи между остатками цистеина).

Под активируемым или переключаемым понимают, что активируемое антитело обладает первым уровнем связывания с мишенью, когда активируемое антитело находится в ингибированном, маскированном или нерасщепленном состоянии (т.е., первой конформации), и вторым уровнем связывания с мишенью в неингибированном, немаскированном и/или расщепленном состоянии (т.е., второй конформации), где второй уровень связывания мишени превышает первый уровень связывания. Как правило, доступ к мишени АВ активируемого антитела больше в присутствии расщепляющего средства, способного

расщеплять СМ, т.е., протеазы, чем в отсутствии такого расщепляющего средства. Таким образом, когда активируемое антитело находится в нерасщепленном состоянии, связывание АВ с мишенью ингибировано и АВ можно замаскировать от связывания с мишенью (т.е., первая конформация является такой, что АВ не может связывать мишень), и в расщепленном состоянии АВ не является ингибированным или является немаскированным для связывания мишени.

СМ и АВ активируемых антител выбирают таким образом, что АВ представляет собой связывающую группу для данной мишени и СМ представляет собой субстрат для протеазы. В некоторых вариантах осуществления протеаза локализована совместно с мишенью в участке лечения или в участке диагностики у субъекта. Как применяют в настоящем документе, совместная локализация относится к нахождению в одном и том же участке или относительно близко по соседству. В некоторых вариантах осуществления протеаза расщепляет СМ, образуя активированное антитело, связывающее мишень, локализованную поблизости от участка расщепления. Активируемые антитела, описанные в настоящем документе, находят конкретное применение, когда, например, протеаза, способная расщеплять участок в СМ, т.е., протеаза, присутствует на относительно более высоких уровнях в содержащей мишень ткани в участке лечения или участке диагностики, чем в ткани в участках, не подлежащих лечению (например, в здоровой ткани). В некоторых вариантах осуществления, СМ по этому описанию расщепляется также посредством одной или нескольких других протеаз. В некоторых вариантах осуществления она представляет собой одну или несколько других протеаз, локализованных совместно с мишенью и ответственных за расщепление СМ *in vivo*.

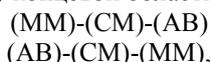
В некоторых вариантах осуществления активируемые антитела обеспечивают уменьшенные токсичность и/или неблагоприятные побочные эффекты, которые в ином случае могут возникнуть в результате связывания АВ в участках, не подлежащих лечению, если АВ не является замаскированным или его связывание с мишенью иным образом не ингибировано.

Как правило, активируемое антитело можно разрабатывать посредством отбора представляющего интерес АВ и конструирования остального активируемого антитела таким образом, что, при конформационном ограничении, ММ обеспечивает маскировку АВ или уменьшение связывания АВ с его мишенью. Структурные критерии дизайна можно принимать во внимание для обеспечения этого функционального признака.

Представлены активируемые антитела, обладающие переключаемым фенотипом желательного динамического диапазона связывания мишени в ингибированной в отличие от неингибированной конформации. Динамический диапазон в основном относится к соотношению (а) максимального детектированного уровня параметра при первом наборе условий к (б) минимальному детектированному значению этого параметра при втором наборе условий. Например, в контексте активируемого антитела, динамический диапазон относится к соотношению (а) максимального детектированного уровня связывания белка-мишени с активируемым антителом в присутствии по меньшей мере одной протеазы, способной расщеплять СМ активируемых антител, к (б) минимальному детектированному уровню связывания белка-мишени с активируемым антителом в отсутствие протеазы. Динамический диапазон активируемого антитела можно рассчитывать как отношение константы диссоциации при обработке активируемого антитела расщепляющим средством (например, ферментом) к константе диссоциации при обработке активируемых антител расщепляющим средством. Чем больше динамический диапазон активируемого антитела, тем лучше переключаемый фенотип активируемого антитела. Активируемые антитела, обладающие относительно более высокими значениями динамического диапазона, (например, более 1), обладают более желательными переключаемыми фенотипами, так что связывание белка-мишени активируемыми антителами происходит в большей степени (например, преимущественно происходит) в присутствии расщепляющего средства (например, фермента), способного расщеплять СМ активируемых антител, чем в отсутствие расщепляющего средства.

Активируемые антитела можно предоставлять во множестве структурных конфигураций. Иллюстративные формулы активируемых антител представлены ниже. Конкретно предусмотрено, что порядок от N- до C-конца АВ, ММ и СМ можно сохранять внутри активируемого антитела. Конкретно предусмотрено также, что СМ и ММ могут перекрываться в аминокислотной последовательности, например, так что СМ содержится внутри ММ.

Например, активируемые антитела можно представить следующей формулой (в порядке от amino(N)-концевой области до карбокси(C)-концевой области:



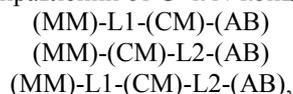
где ММ представляет собой маскирующую группу, СМ представляет собой расщепляемую группу, и АВ представляет собой антитело или его фрагмент. Следует отметить, что несмотря на то, что ММ и СМ указаны как отдельные компоненты в формуле выше, во всех иллюстративных вариантах осуществления (включая формулы), описанных в настоящем документе, предусматривают, что аминокислотные последовательности ММ и СМ могут перекрываться, например, таким образом, что СМ полностью или частично содержится внутри ММ. Кроме того, в формулах выше представлены дополнительные аминокислотные последовательности, которые можно располагать на N-конце или C-конце от элементов акти-

вируемых антител.

В конкретных вариантах осуществления ММ не является природным партнером по связыванию АВ. В некоторых вариантах осуществления ММ не обладает или в основном не обладает гомологией с любым природным партнером по связыванию АВ. В некоторых вариантах осуществления, ММ является не более чем на 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75% или 80% сходной с любым природным партнером по связыванию АВ. В некоторых вариантах осуществления ММ является не более, чем на 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75% или 80% идентичной любому природному партнеру по связыванию АВ. В некоторых вариантах осуществления ММ является не более чем на 50% идентичной любому природному партнеру по связыванию АВ. В некоторых вариантах осуществления ММ является не более, чем на 25% идентичной любому природному партнеру по связыванию АВ. В некоторых вариантах осуществления, ММ является не более чем на 20% идентичной любому природному партнеру по связыванию АВ. В некоторых вариантах осуществления ММ является не более, чем на 10% идентичной любому природному партнеру по связыванию АВ.

Во многих вариантах осуществления может являться желательным вставлять один или несколько линкеров, например, гибких линкеров, в конструкцию активируемого антитела таким образом, чтобы обеспечивать гибкость в одном или нескольких из места стыковки ММ-СМ, места стыковки СМ-АВ или обоих. Например, АВ, ММ, и/или СМ могут не содержать достаточного количества остатков (например, Gly, Ser, Asp, Asn, особенно Gly и Ser, в частности Gly) для обеспечения желательной гибкости. Поэтому переключаемый фенотип таких конструкций активируемых антител может получать преимущество от введения одной или нескольких аминокислот для обеспечения гибкого линкера. Кроме того, как описано ниже, когда активируемое антитело предоставляют в форме конформационно ограниченной конструкции, гибкий линкер можно вставлять функционально для облегчения образования и сохранения циклической структуры нерасщепленного активируемого антитела.

Например, в конкретных вариантах осуществления активируемое антитело содержит одну из следующих формул (где формула ниже представляет собой аминокислотную последовательность либо в направлении от N- к C-концу, либо в направлении от C- к N-концу):



где ММ, СМ и АВ являются такими, как определено выше; где каждый из L1 и L2, независимо и необязательно присутствующий или отсутствующий, представляют собой одинаковые или различные гибкие линкеры, содержащие по меньшей мере 1 гибкую аминокислоту (например, Gly). Кроме того, в вышеуказанных формулах представлены дополнительные аминокислотные последовательности, которые могут быть расположены с N-конца или C-конца от элементов активируемых антител. Примеры включают в себя, но без ограничения, нацеливающие группы (например, лиганд для рецептора клетки, присутствующей в ткани-мишени) и увеличивающие время полужизни в сыворотке группы (например, полипептиды, связывающие сывороточные белки, такие как иммуноглобулин (например, IgG) или сывороточные альбумин (например, человеческий сывороточный альбумин (HAS)).

СМ специфически расщепляет по меньшей мере одна протеаза со скоростью приблизительно $0,001\text{-}1500 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$ или по меньшей мере 0,001, 0,005, 0,01, 0,05, 0,1, 0,5, 1, 2,5, 5, 7,5, 10, 15, 20, 25, 50, 75, 100, 125, 150, 200, 250, 500, 750, 1000, 1250, или $1500 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$. В некоторых вариантах осуществления СМ специфически расщепляется со скоростью приблизительно $100000 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$. В некоторых вариантах осуществления СМ специфически расщепляется со скоростью от приблизительно 1×10^2 до приблизительно $1 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$ (т.е., от приблизительно 1×10^2 до приблизительно $1 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$).

Для специфического расщепления ферментом фермент и СМ приводят в контакт. Когда активируемое антитело, содержащее АВ, присоединенное к ММ и СМ, находится в присутствии мишени и достаточной активности фермента, СМ можно расщеплять. Достаточная активность фермента может относиться к способности фермента вступать в контакт с СМ и осуществлять расщепление. Можно легко предположить, что фермент может находиться поблизости от СМ, но являться неспособным к расщеплению из-за других клеточных факторов или белковой модификации фермента.

Линкеры, пригодные для применения в композициях, описанных в настоящем документе, как правило, представляют собой линкеры, обеспечивающие гибкость модифицированного АВ или активируемых антител для облегчения ингибирования связывания АВ с мишенью. Такие линкеры, как правило, обозначают как гибкие линкеры. Пригодные линкеры можно легко выбирать, и они могут иметь любую из подходящей различной длины, например, от 1 аминокислоты (например, Gly) до 20 аминокислот, от 2 аминокислот до 15 аминокислот, от 3 аминокислот до 12 аминокислоты, включая от 4 аминокислот до 10 аминокислот, от 5 аминокислот до 9 аминокислот, от 6 аминокислот до 8 аминокислот, или от 7 аминокислоты до 8 аминокислот, и могут иметь длину 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 аминокислот.

Иллюстративные гибкие линкеры включают в себя глициновые полимеры (G)_n, глицинсериновые

полимеры (включая, например, (GS)_n, (GSGGS)_n (SEQ ID NO: 339) и (GGGS)_n (SEQ ID NO: 340), где n представляет собой целое число по меньшей мере один), глицин-аланиновые полимеры, аланин-сериновые полимеры, и другие гибкие линкеры, известные в данной области. Глициновые и глицин-сериновые полимеры являются относительно неструктурированными, и таким образом, могут являться способными служить нейтральной связкой между компонентами. Глицин охватывает значительно большее пространство фи-пси, даже по сравнению с аланином, и является намного менее ограниченным, чем остатки с более длинными боковыми цепями (См. Scheraga, Rev. Computational Chem. 11173-142 (1992)). Иллюстративные гибкие линкеры включают в себя, но без ограничения, Gly-Gly-Ser-Gly (SEQ ID NO: 341), Gly-Gly-Ser-Gly-Gly (SEQ ID NO: 342), Gly-Ser-Gly-Ser-Gly (SEQ ID NO: 343), Gly-Ser-Gly-Gly-Gly (SEQ ID NO: 344), Gly-Gly-Gly-Ser-Gly (SEQ ID NO: 345), Gly-Ser-Ser-Ser-Gly (SEQ ID NO: 346) и т.п. Специалисту в данной области понятно, что дизайн активируемых антител может включать линкеры, являющиеся полностью или частично гибкими, так что линкер может содержать гибкий линкер, так же как одну или несколько частей, обеспечивающих менее гибкую структуру, для обеспечения желательной структуры активируемых антител.

Описание относится также к композициям и способам, включающим в себя активируемое антитело против CD71, содержащее антитело или фрагмент антитела (AB), специфически связывающие CD71, где AB связано с маскирующей группой (MM), уменьшающей способность AB связывать его мишень. В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело против CD71 дополнительно содержит расщепляемую группу (CM), являющуюся субстратом для протеазы. Композиции и способы, представленные в настоящем документе, позволяют присоединение одного или нескольких средств к одному или нескольким остаткам цистеина в AB без нарушения активности (например, маскирующей, активирующей или связывающей активности) активируемого антитела против CD71. В некоторых вариантах осуществления композиции и способы, представленные в настоящем документе, позволяют присоединение одного или нескольких средств к одному или нескольким остаткам цистеина в AB без восстановления или нарушения иным образом одной или нескольких дисульфидных связей внутри MM. С использованием композиций и способов, представленных в настоящем документе, получают активируемое антитело против CD71, которое является конъюгированным с одним или несколькими средствами, например, с любым из множества терапевтических, диагностических и/или профилактических средств, например, в некоторых вариантах осуществления, где ни одно из средства(средств) не является конъюгированным с MM активируемого антитела против CD71. С использованием композиций и способов, представленных в настоящем документе, получают конъюгированные активируемые антитела против CD71, в которых MM сохраняет способность эффективно и действенно маскировать AB активируемого антитела в нерасщепленном состоянии. С использованием композиций и способов, представленных в настоящем документе, получают конъюгированные активируемые антитела против CD71, в которых активируемое антитело все еще является активированным, т.е., расщепленным, в присутствии протеазы, которая может расщеплять CM.

Активируемые антитела против CD71 обладают по меньшей мере одной точкой для конъюгации со средством, но в способах и композициях, представленных в настоящем документе, менее, чем все возможные точки конъюгации, являются доступными для конъюгации со средством. В некоторых вариантах осуществления одна или несколько точек конъюгации представляют собой атомы серы, вовлеченные в дисульфидные связи. В некоторых вариантах осуществления одна или несколько точек конъюгации представляют собой атомы серы, вовлеченные в межцепевые дисульфидные связи. В некоторых вариантах осуществления одна или несколько точек конъюгации представляют собой атомы серы, вовлеченные в межцепевые сульфидные связи, но не атомы серы, вовлеченные в внутривещечные дисульфидные связи. В некоторых вариантах осуществления одна или несколько точек конъюгации представляют собой атомы серы из цистеина или других аминокислотных остатков, содержащих атом серы. Такие остатки могут встречаться в природе в структуре антитела, или их можно вводить в антитело посредством сайт-направленного мутагенеза, химического превращения или несопадающего включения природных аминокислот.

Представлены также способы получения конъюгата активируемого антитела против CD71, обладающего одной или несколькими межцепевыми дисульфидными связями в AB и одной или несколькими внутривещечными дисульфидными связями в MM, и представлено лекарственное средство, реакционноспособное по отношению к свободным тиолам. Способ в общем включает в себя частичное восстановление межцепевых дисульфидных связей в активируемом антителе с помощью восстанавливающего средства, например, такого как TCEP; и конъюгирование лекарственного средства, реакционноспособного по отношению к свободным тиолам, с частично восстановленным активируемым антителом. Как применяют в настоящем документе, термин частичное восстановление относится к ситуациям, когда активируемое антитело против CD71 приводят в контакт с восстанавливающим средством, и менее, чем все дисульфидные связи, например, менее, чем все возможные участки конъюгации, восстанавливают. В некоторых вариантах осуществления, и менее, чем 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 90%, 85%, 80%, 75%, 70%, 65%, 60%, 55%, 50%, 45%, 40%, 35%, 30%, 25%, 20%, 15%, 10% или менее чем 5% из всех возможных участков конъюгации являются восстановленными.

В других вариантах осуществления, представлен способ восстановления и конъюгирования средства, например, лекарственного средства, с активируемым антителом против CD71, обеспечивающий избирательность расположения средства. Способ в основном включает в себя частичное восстановление активируемого антитела против CD71 с использованием восстанавливающего средства, таким образом, что любые участки конъюгации в маскирующей группе или другой не относящейся к АВ части активируемого антитела не являются восстановленными, и конъюгацию средства с межцепевыми тиолами в АВ. Участок(участки) конъюгации выбирают таким образом, чтобы позволять желательное расположение средства, чтобы позволять конъюгации происходить в желательном участке. Восстанавливающее средство представляет собой, например, ТСЕР. Условия реакции восстановления, например, такие как отношение восстанавливающего средства к активируемому антителу, длительность инкубации, температура во время инкубации, pH восстанавливающего реакционного раствора и т.д., определяют посредством идентификации условий, в которых получают конъюгированное активируемое антитело, в котором ММ сохраняет способность эффективно и действенно маскировать АВ активируемого антитела в нерасщепленном состоянии. Отношение восстанавливающего средства к активируемому антителу против CD71 можно менять в зависимости от активируемого антитела. В некоторых вариантах осуществления, отношение восстанавливающего средства к активируемому антителу против CD71 может лежать в диапазоне от приблизительно 20:1 до 1:1, от приблизительно 10:1 до 1:1, от приблизительно 9:1 до 1:1, от приблизительно 8:1 до 1:1, от приблизительно 7:1 до 1:1, от приблизительно 6:1 до 1:1, от приблизительно 5:1 до 1:1, от приблизительно 4:1 до 1:1, от приблизительно 3:1 до 1:1, от приблизительно 2:1 до 1:1, от приблизительно 20:1 до 1:1,5, от приблизительно 10:1 до 1:1,5, от приблизительно 9:1 до 1:1,5, от приблизительно 8:1 до 1:1,5, от приблизительно 7:1 до 1:1,5, от приблизительно 6:1 до 1:1,5, от приблизительно 5:1 до 1:1,5, от приблизительно 4:1 до 1:1,5, от приблизительно 3:1 до 1:1,5, от приблизительно 2:1 до 1:1,5, от приблизительно 1,5:1 до 1:1,5, или от приблизительно 1:1 до 1:1,5. В некоторых вариантах осуществления, отношение лежит в диапазоне от приблизительно 5:1 до 1:1. В некоторых вариантах осуществления, отношение лежит в диапазоне от приблизительно 5:1 до 1,5:1. В некоторых вариантах осуществления, отношение лежит в диапазоне от приблизительно 4:1 до 1:1. В некоторых вариантах осуществления, отношение лежит в диапазоне от приблизительно 4:1 до 1,5:1. В некоторых вариантах осуществления, отношение лежит в диапазоне от приблизительно 8:1 до приблизительно 1:1. В некоторых вариантах осуществления отношение лежит в диапазоне от приблизительно 2,5:1 до 1:1.

В некоторых вариантах осуществления представлен способ восстановления межцепевых дисульфидных связей в АВ активируемого антитела против CD71 и конъюгации средства, например, содержащего тиол средства, такого как лекарственное средство, с полученными межцепевыми тиолами, для избирательного расположения средства(средств) на АВ. Способ в общем включает в себя частичное восстановление АВ с использованием восстанавливающего средства для образования по меньшей мере двух межцепевых тиолов без образования всех возможных межцепевых тиолов в активируемом антителе; и конъюгацию средства с межцепевыми тиолами частично восстановленного АВ. Например, АВ активируемого антитела частично восстанавливают в течение приблизительно 1 часа при приблизительно 37°C при желательном соотношении восстанавливающего средства: активируемое антитело. В некоторых вариантах осуществления отношение восстанавливающего средства к активируемому антителу может лежать в диапазоне от приблизительно 20:1 до 1:1, от приблизительно 10:1 до 1:1, от приблизительно 9:1 до 1:1, от приблизительно 8:1 до 1:1, от приблизительно 7:1 до 1:1, от приблизительно 6:1 до 1:1, от приблизительно 5:1 до 1:1, от приблизительно 4:1 до 1:1, от приблизительно 3:1 до 1:1, от приблизительно 2:1 до 1:1, от приблизительно 20:1 до 1:1,5, от приблизительно 10:1 до 1:1,5, от приблизительно 9:1 до 1:1,5, от приблизительно 8:1 до 1:1,5, от приблизительно 7:1 до 1:1,5, от приблизительно 6:1 до 1:1,5, от приблизительно 5:1 до 1:1,5, от приблизительно 4:1 до 1:1,5, от приблизительно 3:1 до 1:1,5, от приблизительно 2:1 до 1:1,5, от приблизительно 1,5:1 до 1:1,5, или от приблизительно 1:1 до 1:1,5. В некоторых вариантах осуществления отношение лежит в диапазоне от приблизительно 5:1 до 1:1. В некоторых вариантах осуществления отношение лежит в диапазоне от приблизительно 5:1 до 1,5:1. В некоторых вариантах осуществления отношение лежит в диапазоне от приблизительно 4:1 до 1:1. В некоторых вариантах осуществления, отношение лежит в диапазоне от приблизительно 4:1 до 1,5:1. В некоторых вариантах осуществления, отношение лежит в диапазоне от приблизительно 8:1 до приблизительно 1:1. В некоторых вариантах осуществления отношение лежит в диапазоне от приблизительно 2,5:1 до 1:1.

Содержащий тиол реагент может представлять собой, например, цистеин или N-ацетилцистеин. Восстанавливающее средство может представлять собой, например, ТСЕР. В некоторых вариантах осуществления восстановленное активируемое антитело можно очищать перед конъюгацией, с использованием например, хроматографии на колонке, диализа или диафильтрации. Альтернативно, восстановленное антитело не очищают после частичного восстановления и перед конъюгацией.

Изобретение относится также к частично восстановленным активируемым антителам против CD71, в которых по меньшей мере одна межцепевая дисульфидная связь в активируемом антителе восстановлена с использованием восстанавливающего средства без затрагивания каких-либо внутрицепевых дисульфидных связей в активируемом антителе, где активируемое антитело содержит антитело или его антигенсвязывающий фрагмент (АВ), специфически связывающие CD71, маскирующую группу (ММ),

ингибирующую связывание АВ активируемого антитела в нерасщепленном состоянии с мишенью CD71, и расщепляемую группу (СМ) присоединенную к АВ, где СМ представляет собой полипептид, функционирующий в качестве субстрата для протеазы. В некоторых вариантах осуществления ММ присоединена к АВ посредством СМ. В некоторых вариантах осуществления одна или несколько внутрицепочечная дисульфидная связь(связи) активируемого антитела не затронуты восстанавливающим средством. В некоторых вариантах осуществления, одна или несколько внутрицепочечная дисульфидная связь(связи) ММ внутри активируемого антитела не затронуты восстанавливающим средством. В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело в нерасщепленном состоянии обладает следующей структурной аранжировкой от N-конца к С-концу: ММ-СМ-АВ или АВ-СМ-ММ. В некоторых вариантах осуществления восстанавливающее средство представляет собой ТСЕР.

В других вариантах осуществления с использованием способа восстановления и конъюгации средства, например, лекарственного средства, с активируемым антителом против CD71 получают избирательность расположения средства посредством предоставления активируемого антитела против CD71 с определенным количеством и расположением остатков лизина и/или цистеина. В некоторых вариантах осуществления определенное количество остатков лизина и/или цистеина выше или ниже количества соответствующих остатков в аминокислотной последовательности исходного антитела или активируемого антитела. В некоторых вариантах осуществления определенное количество остатков лизина и/или цистеина может приводить к определенному количеству эквивалентов средства, которое можно конъюгировать с антителом против CD71 или активируемым антителом против CD71. В некоторых вариантах осуществления определенное количество остатков лизина и/или цистеина может приводить к определенному количеству эквивалентов средства, которое можно конъюгировать с антителом против CD71 или активируемым антителом против CD71 сайт-специфическим образом. В некоторых вариантах осуществления модифицированное активируемое антитело модифицируют с использованием одной или нескольких не природных аминокислот сайтспецифическим образом, таким образом, в некоторых вариантах осуществления, ограничивая конъюгацию средств только участками не природных аминокислот. В некоторых вариантах осуществления антитело против CD71 или активируемое антитело против CD71 с определенным количеством и положениями остатков лизина и/или цистеина можно частично восстанавливать с использованием восстанавливающего средства, как обсуждают в настоящем документе, так что любые участки конъюгации в маскирующей группе или другой не относящейся к АВ части активируемого антитела не восстанавливают, и конъюгации средства с межцепевыми тиолами в АВ.

Описание относится также к частично восстановленным активируемым антителам, в которых по меньшей мере одна межцепевая дисульфидная связь в активируемом антителе восстановлена с использованием восстанавливающего средства без затрагивания любых внутрицепочечных дисульфидных связей в активируемом антителе, где активируемое антитело содержит антитело или его антигенсвязывающий фрагмент (АВ), специфически связывающие мишень, например, CD71, маскирующую группу (ММ), ингибирующую связывание АВ активируемого антитела в нерасщепленном состоянии с мишенью, и расщепляемую группу (СМ) присоединенную к АВ, где СМ представляет собой полипептид, функционирующий в качестве субстрата по меньшей мере для одной протеазы. В некоторых вариантах осуществления ММ присоединена к АВ посредством СМ. В некоторых вариантах осуществления одна или несколько внутрицепочечная дисульфидная связь(связи) активируемого антитела не затронута восстанавливающим средством. В некоторых вариантах осуществления одна или несколько внутрицепочечная дисульфидная связь(связи) ММ внутри активируемого антитела не затронута восстанавливающим средством. В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело в нерасщепленном состоянии обладает следующей структурной аранжировкой от N-конца к С-концу: ММ-СМ-АВ или АВ-СМ-ММ. В некоторых вариантах осуществления восстанавливающее средство представляет собой ТСЕР.

В некоторых вариантах осуществления активируемые антитела, описанные в настоящем документе, содержат также средство, конъюгированное с активируемым антителом. В некоторых вариантах осуществления конъюгированное средство представляет собой лекарственное средство, такое как противовоспалительное и/или антинеопластическое средство. В таких вариантах осуществления средство является конъюгированным с углеводной группой активируемого антитела, например, в некоторых вариантах осуществления, где углеводная группа локализована вне антигенсвязывающей области антитела или антигенсвязывающего фрагмента в активируемом антителе. В некоторых вариантах осуществления средство является конъюгированным с сульфгидрильной группой антитела или антигенсвязывающего фрагмента в активируемом антителе.

В некоторых вариантах осуществления средство представляет собой цитотоксическое средство, такое как токсин (например, ферментативно активный токсин бактериального, грибкового, растительного или животного происхождения, или его фрагменты), или радиоактивный изотоп (т.е., радиоконъюгат).

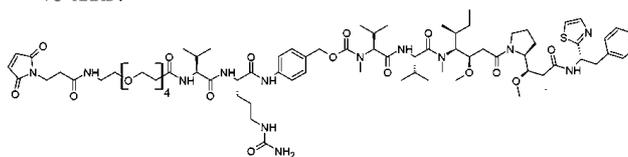
В некоторых вариантах осуществления средство представляет собой поддающуюся детекции группу например, такую как метка или другой маркер. Например, средство представляет собой или содержит радиоактивно меченную аминокислоту, одну или несколько биотинилированных групп, которые можно детектировать посредством меченого авидина (например, стрептавидина, обладающего флуоресцентным маркером или ферментативной активностью, которую можно детектировать посредством оптических или

калориметрических способов), одного или нескольких радиоактивных изотопов или радиоактивных ядер, одной или нескольких флуоресцентных меток, одной или нескольких флуоресцентных меток, и/или одного или нескольких хемилюминесцентных средств. В некоторых вариантах осуществления поддающиеся детекции средства присоединены посредством спейсерных молекул.

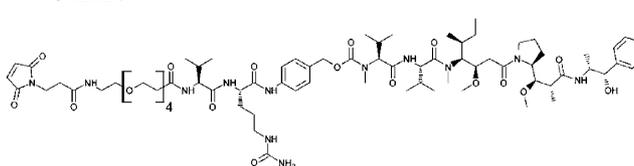
Описание относится также к иммуноконъюгатам, содержащим антитело, конъюгированное с цитотоксическим средством, таким как токсин (например, ферментативно активный токсин бактериального, грибкового, растительного или животного происхождения, или его фрагменты), или радиоактивный изотоп (т.е., радиоконоъюгат). Пригодные цитотоксические средства включают в себя, например, доластатин и их производные (например, ауристатин E, AFP, MMAF, MMAE, MMAD, DMAF, DMAE). Например, средство представляет собой монометилауристатин E (MMAE) или монометилауристатин D (MMAD). В некоторых вариантах осуществления средство представляет собой средство, выбранное из групп, перечисленных в табл. 5. В некоторых вариантах осуществления средство представляет собой доластатин. В некоторых вариантах осуществления средство представляет собой ауристатин или его производное. В некоторых вариантах осуществления средство представляет собой ауристатин E или его производное. В некоторых вариантах осуществления средство представляет собой монометилауристатин E (MMAE). В некоторых вариантах осуществления средство представляет собой монометилауристатин D (MMAD). В некоторых вариантах осуществления средство представляет собой майтанзиноид или производное майтанзиноида. В некоторых вариантах осуществления средство представляет собой DM1 или DM4. В некоторых вариантах осуществления средство представляет собой дуокармицин или его производное. В некоторых вариантах осуществления средство представляет собой калихеамицин или его производное. В некоторых вариантах осуществления средство представляет собой пирролобензодиазепин. В некоторых вариантах осуществления средство представляет собой димер пирролобензодиазепина.

В некоторых вариантах осуществления средство является связанным с АВ с использованием линкера малеинимид-капроил-валин-цитруллин или линкера малеинимид-PEG-валин-цитруллин. В некоторых вариантах осуществления средство является связанным с АВ с использованием линкера малеинимид-капроил-валин-цитруллин. В некоторых вариантах осуществления средство является связанным с АВ с использованием линкера малеинимид-PEG-валин-цитруллин. В некоторых вариантах осуществления средство представляет собой монометилауристатин D (MMAD), связанный с АВ с использованием линкера малеинимид-PEG-валин-цитруллин-пара-аминобензилоксикарбонил, и нагруженную этим линкером конструкцию обозначают в настоящем документе как "vc-MMAD". В некоторых вариантах осуществления средство представляет собой монометилауристатин E (MMAE), связанный с АВ с использованием линкера малеинимид-PEG-валин-цитруллин-пара-аминобензилоксикарбонил, и нагруженную этим линкером конструкцию обозначают в настоящем документе как "vc-MMAE". В некоторых вариантах осуществления, средство является связанным с АВ с использованием линкера малеинимид-PEG-валин-цитруллин. В некоторых вариантах осуществления средство представляет собой монометилауристатин D (MMAD), связанный с АВ с использованием линкера малеинимид-бис-PEG-валин-цитруллин-пара-аминобензилоксикарбонил, и нагруженную этим линкером конструкцию обозначают в настоящем документе как "PEG2-vc-MMAD". Структуры vc-MMAD, vc-MMAE и PEG2-vc-MMAD показаны ниже:

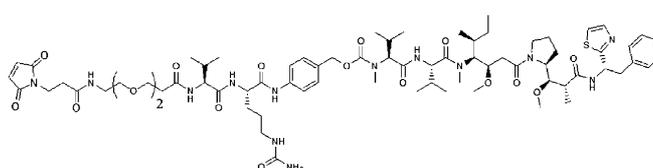
vc-MMAD:



vc-MMAE:



PEG2-vc-MMAD:



Описание относится также к конъюгированным активируемым антителам, содержащим активируемое антитело, связанное с нагрузкой монометилауристатина D (MMAD), где активируемое антитело содержит антитело или его антигенсвязывающий фрагмент (АВ), специфически связывающие мишень, маскирующую группу (ММ), ингибирующую связывание АВ активируемого антитела в нерасщепленном

состоянии с мишенью, и расщепляемую группу (СМ), присоединенную к АВ, и СМ представляет собой полипептид, функционирующий в качестве субстрата для по меньшей мере одной протеазы ММР.

В некоторых вариантах осуществления, конъюгированное с ММАД активируемое антитело можно конъюгировать с использованием любого из нескольких способов присоединения средств к АВ: (а) присоединение к углеводным группам АВ или (b) присоединение к сульфгидрильным группам АВ или (с) присоединение к аминогруппам АВ, или (d) присоединение к карбоксилатным группам АВ.

В некоторых вариантах осуществления нагрузка ММАД является конъюгированной с АВ посредством линкера. В некоторых вариантах осуществления нагрузка ММАД является конъюгированной с цистеином в АВ посредством линкера. В некоторых вариантах осуществления нагрузка ММАД является конъюгированной с лизином в АВ посредством линкера. В некоторых вариантах осуществления нагрузка ММАД является конъюгированной с другим остатком АВ посредством линкера, таким как остатки, описанные в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления линкер представляет собой содержащий тиол линкер. В некоторых вариантах осуществления линкер представляет собой расщепляемый линкер. В некоторых вариантах осуществления линкер представляет собой нерасщепляемый линкер. В некоторых вариантах осуществления линкер выбран из группы, состоящей из линкеров, показанных в табл. 6 и 7. В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело и нагрузка ММАД связаны посредством линкера малеинимид-капроил-валин-цитруллин. В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело и нагрузка ММАД связаны посредством линкера малеинимид-PEG-валин-цитруллин. В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело и нагрузка ММАД связаны посредством линкера малеинимид-капроил-валин-цитруллин-пара-аминобензилоксикарбонил. В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело и нагрузка ММАД связаны посредством линкера малеинимид-PEG-валин-цитруллин-пара-аминобензилоксикарбонил. В некоторых вариантах осуществления нагрузка ММАД является конъюгированной с АВ с использованием технологии частичного восстановления и конъюгации, описанной в настоящем документе.

В некоторых вариантах осуществления компонент полиэтиленгликоля (РЕG) линкера по настоящему описанию сформирован из 2 мономеров этиленгликоля, 3 мономеров этиленгликоля, 4 мономеров этиленгликоля, 5 мономеров этиленгликоля, 6 мономеров этиленгликоля, 7 мономеров этиленгликоля 8 мономеров этиленгликоля, 9 мономеров этиленгликоля или по меньшей мере 10 мономеров этиленгликоля. В некоторых вариантах осуществления по настоящему описанию компонент РЕG представляет собой разветвленный полимер. В некоторых вариантах осуществления по настоящему описанию компонент РЕG представляет собой неразветвленный полимер. В некоторых вариантах осуществления полимерный компонент РЕG является функционализированным с использованием аминогруппы или ее производного, карбоксильной группы или ее производного или как аминогруппы или ее производного, так и карбоксильной группы или ее производного.

В некоторых вариантах осуществления компонент РЕG линкера по настоящему описанию представляет собой аминок-тетраэтиленгликолькарбоксильную группу или ее производное. В некоторых вариантах осуществления компонент РЕG линкера по настоящему описанию представляет собой аминок-триэтиленгликолькарбоксильную группу или ее производное. В некоторых вариантах осуществления компонент РЕG линкера по настоящему описанию представляет собой аминок-диэтиленгликолькарбоксильную группу или ее производное. В некоторых вариантах осуществления аминокпроизводное представляет собой формирование амидной связи между аминокгруппой и карбоксильной группой, с которой оно конъюгировано. В некоторых вариантах осуществления карбоксильное производное представляет собой формирование амидной связи между карбоксильной группой и аминокгруппой, с которой оно конъюгировано. В некоторых вариантах осуществления, а карбоксил производное представляет собой формирование сложноэфирной связи между карбоксильной группой и гидроксильной группой, с которой оно конъюгировано.

Ферментативно активные токсины и их фрагменты, которые можно использовать, включают в себя цепь А дифтерийного токсина, несвязывающие активные фрагменты дифтерийного токсина, цепь А экзотоксина (из *Pseudomonas aeruginosa*), цепь А рицина, цепь А абрина, цепь А модецина, альфа-сарцин, белки *Aleurites fordii*, белки-диантины, белки *Phytolaca americana* (РАPI, РАPII и РАР-S), ингибитор *mordica charantia*, курцин, кротин, ингибитор *saraonaria officinalis*, гелонин, митогеллин, рестриктоцин, феномицин, эномицин и трикотечены. Множество радиоактивных изотопов доступны для получения радиоконъюгированных антител. Примеры включают в себя ^{212}Bi , ^{131}I , ^{131}In , ^{90}Y и ^{186}Re .

Конъюгаты антитела и цитотоксического средства получают с использованием множества бифункциональных средств для сшивания белков, таких как N-сукцинимидил-3-(2-пиридилдитиол) пропионат (SPDP), имиотиолан (ИТ), бифункциональные производные имидоэфиров (такие как диметиладипимидат HCL), активные сложные эфиры (такие как дисукцинимидилсуберат), альдегиды (такие как глутаральдегид), бис-азидосоединения (такие как бис(п-азидобензоил)гександиамин), производные бис-диазония (такие как бис-(п-диазонийбензоил)этилендиамин), диизоцианаты (такие как толуол-2,6-диизоцианат) и бис-активные соединения фтора (такие как 1,5-дифтор-2,4-динитробензол). Например, иммунотоксин рицин можно получать, как описано в Vitetta et al., Science 238: 1098 (1987). Меченная углеродом-14 1-изотиоцианатобензил-3-метилдиэтилентриаминпентауксусная кислота (МХ-ДТРА) явля-

ется иллюстративным хелатирующим агентом для конъюгации радиоактивного изотопа с антителом. (См. WO94/11026).

В табл. 5 перечислены некоторые из иллюстративных лекарственных средств, которые можно применять в описании, описанном в настоящем документе, но это никаким образом не рассматривают как исчерпывающий список.

Таблица 5. Иллюстративные лекарственные средства для конъюгации

ЦИТОТОКСИЧЕСКИЕ СРЕДСТВА

Ауристатины	Турбостатин
Ауристин Е	Фенстатины
Монометилауристин D (MMAD)	Гидроксибенстатин
Монометилауристин Е (MMAE)	Спонгистатин 5
Десметилауристин Е (DMAE)	Спонгистатин 7
Ауристин F	Галистатин 1
Монометилауристин F (MMAF)	Галистатин 2
Десметилауристин F (DMAF)	Галистатин 3
Производные ауристината, например, его амиды	Модифицированные бриостатины
Ауристинтирамин	Галокомпстатины
Ауристинхинолин	Пирролобензимидазолы (PBI)
Доластатины	Цибростатин 6
Производные доластината	Доксалиформ
Доластин 16 DmJ	Аналоги антрациклинов
Доластин 16 Dpv	
Майтанзиноиды, например, DM-1; DM-4	
Производные майтанзиноида	Аналог сематодина (SemCH2-SH)
Дуокармицин	Вариант токсина A <i>Pseudomonas</i> (PE38)
Производные дуокармицина	Вариант токсина A <i>Pseudomonas</i> (ZZ-PE38)
Альфа-аманитин	ZJ-101
Антрациклины	OSW-1
Доксорубин	4-нитробензилоксикарбонил
Даунорубин	Производные Об-бензилгуанина
Бриостатины	Ингибиторы топоизомеразы
Камптотecin	Гемистерлин
Производные камптотeciна	Цефалотаксин
7-замещенный камптотecin	Гомогаррингтонин
10, 11-Диформетиленидиоксикамптотecin	Димеры пирролобензодиазепина (PBD)
Комбретастатины	Пирролобензодиазепины
Дебромаплизиатоксин	Функционализированные пирролобензодиазепины
Кагалалид-Г	Функционализированные димеры пирролобензодиазепинов
Дискодермолид	Калихеамицины
Эктейнацидины	Подофиллотоксины
	Таксаны
	Алкалоиды барвинка

ПРОТИВОВИРУСНЫЕ СРЕДСТВА

Ацикловир
Vira A
Симметрел

ПРОТИВОГРИБКОВЫЕ СРЕДСТВА

Нистатин

ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ

АНТИНЕОПЛАСТИЧЕСКИЕ СРЕДСТВА

Адриамицин
Церубидин
Блеомицин
Алкеран
Велбан
Онковин
Фторурацил
Метотрексат
Тиотепа
Висантрон
Новантрон
Тиогуанин
Прокарбизин

Цитарабин

АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫЕ СРЕДСТВА

Аминогликозиды
Стрептомицин
Неомицин
Канамицин
Амикацин
Гентамицин
Тобрамицин
Стрептомицин В
Спектиномицин
Ампициллин
Сульфаниламид
Полмиксин
Хлорамфеникол

ПОДАЮЩИЕСЯ КОНЪЮГАЦИИ РЕАГЕНТЫ ДЛЯ ДЕТЕКЦИИ

Флуоресцеин и его производные
Изотиоцианат флуоресцеина (FITC)

РАДИОАКТИВНЫЕ ЛЕКАРСТВЕННЫЕ СРЕДСТВА

¹²⁵I
¹³¹I
⁸⁹Zr
¹¹¹In
¹²³I
¹³¹I
^{99m}Tc
²⁰¹Tl
¹³³Xe
¹¹C
⁶²Cu
¹⁸F
⁶⁸Ga
¹³N
¹⁵O
³⁸K
⁸²Rb
^{99m}Tc (Технеций)

ТЯЖЕЛЫЕ МЕТАЛЛЫ

Барий
Золото
Платина

СРЕДСТВА ПРОТИВ МИКОПЛАЗМЫ

Тилозин
Спектиномицин

Специалисту в данной области известно, что большое множество возможных групп можно присоединять к антителам, полученным по этому описанию. (См., например, "Conjugate Vaccines", Contributions

to Microbiology and Immunology, J. M. Cruse и R. E. Lewis, Jr (eds), Carger Press, New York, (1989), полное содержание которого приведено в настоящем документе в качестве ссылки).

Присоединение можно осуществлять посредством любой химической реакции, связывающей две молекулы, при условии, что антитело и другая группа сохраняют их соответствующую активность. Это связывание может включать в себя множество химических механизмов, например, ковалентное связывание, аффинное связывание, интеркаляцию, координационное связывание и комплексообразование. В некоторых вариантах осуществления связывание, однако, представляет собой ковалентное связывание. Ковалентное связывание можно осуществлять либо посредством прямой конденсации существующих боковых цепей, либо посредством включения внешних молекул-мостиков. Множество двухвалентных или поливалентных связывающих средств можно использовать для соединения белковых молекул, таких как антитела по настоящему описанию, с другими молекулами. Например, репрезентативные связывающие средства могут включать в себя органические соединения, такие как сложные тиоэфиры, карбодиимиды, сложные эфиры сукцинимиды, диизоцианаты, глутаральдегид, диазобензолы и гексаметилендиамины. Это перечисление не предназначено, чтобы являться исчерпывающим для различных классов связывающих средств, известных в данной области, но, вместо этого, является иллюстративным для наиболее распространенных связывающих средств. (См. Killen and Lindstrom, *Jour. Immun.* 133: 1335-2549 (1984); Jansen et al., *Immunological Reviews* 62:185-216 (1982); и Vitetta et al., *Science* 238: 1098 (1987).

В некоторых вариантах осуществления в дополнение к композициям и способам, представленным в настоящем документе, конъюгированное активируемое антитело можно также модифицировать для сайт-специфической конъюгации посредством модифицированных аминокислотных последовательностей, вставленных или иным образом включенных в последовательность активируемого антитела. Эти модифицированные аминокислотные последовательности разработаны, чтобы обеспечивать контролируемое расположение и/или дозирование конъюгированного средства внутри конъюгированного активируемого антитела. Например, активируемое антитело можно конструировать для включения замен на цистеин в положениях легкой и тяжелой цепей, которые обеспечивают реакционноспособные тиоловые группы и ни оказывают отрицательного влияния на сворачивание и сборку белка, ни изменяют связывание антигена. В некоторых вариантах осуществления, активируемое антитело можно конструировать для включения или введения иным образом одного или нескольких неприродных аминокислотных остатков в активируемое антитело для обеспечения пригодных участков для конъюгации. В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело можно конструировать для включения или введения иным образом ферментативно активируемых пептидных последовательностей в последовательность активируемого антитела.

Пригодные линкеры описаны в литературе. (См., например, Ramakrishnan, S. et al., *Cancer Res.* 44:201-208 (1984), где описано применение MBS (М-малеимидобензоил-N-гидроксисукцинимидного сложного эфира). См. также, Патент США № 5030719, где описано применение галогенированного производного ацетилгидраза, присоединенного к антителу посредством олигопептидного линкера. В некоторых вариантах осуществления, пригодные линкеры включают в себя: (i) EDC (гидрохлорид (1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимида); (ii) SMPT (4-сукцинимидилокскарбонил-альфа-метил-альфа-(2-пиридилдитио)толуол (Pierce Chem. Co., Кат. (21558G); (iii) SPDP (сукцинимидил-6-[3-(2-пиридилдитио)пропионамидо]гексаноат) (Pierce Chem. Co., Кат. #21651G); (iv) Сульфо-LC-SPDP (сульфосукцинимидил-6-[3-(2-пиридилдитио)пропионамид]гексаноат (Pierce Chem. Co. Кат. #2165-G); и (v) сульфо-NHS (N-гидроксисульфосукцинимид: Pierce Chem. Co., Кат. #24510), конъюгированный с EDC. Дополнительные линкеры включают в себя, но без ограничения, SMCC ((сукцинимидил 4-(N-малеимидометил)циклогексан-1-карбоксилат), сульфо-SMCC (сульфосукцинимидил-4-(N-малеимидометил)циклогексан-1-карбоксилат), SPDB (N-сукцинимидил-4-(2-пиридилдитио)бутаноат) или сульфо-SPDB (N-сукцинимидил-4-(2-пиридилдитио)-2-сульфобутаноат).

Описанные выше линкеры содержат компоненты, имеющие различные характеристики, что приводит к получению конъюгатов с различными физико-химическими свойствами. Например, сложные эфиры сульфо-NHS с алкилкарбоксилатами являются более стабильными, чем сложные эфиры сульфо-NHS с ароматическими карбоксилатами. Линкеры, содержащие сложные эфиры NHS, являются менее растворимыми, чем сложные эфиры сульфо-NHS. Кроме того, линкер SMPT содержит стерически затрудненную дисульфидную связь и может образовывать конъюгаты с увеличенной стабильностью. Дисульфидные связи, как правило, являются менее стабильными, чем другие связи, поскольку дисульфидная связь расщепляется *in vitro*, уменьшая количество доступного конъюгата. Сульфо-NHS, в частности, может увеличивать стабильность карбодиимидных связывающих средств. Карбодиимидные связывающие средства (такие как EDC), при использовании в сочетании с сульфо-NHS, образуют сложные эфиры, более устойчивые к гидролизу, чем соединения, полученные посредством только реакции карбодиимидного сочетания.

В некоторых вариантах осуществления линкеры являются расщепляемыми. В некоторых вариантах осуществления линкеры являются нерасщепляемыми. В некоторых вариантах осуществления, присутствуют два или более линкера. Два или более линкера все являются одинаковыми, т.е., расщепляемыми или нерасщепляемыми, или два или более линкера являются различными, т.е., по меньшей мере один

расщепляемый и по меньшей мере один нерасщепляемый.

По настоящему описанию используют несколько способов присоединения средств в АВ: (а) присоединение к углеводным группам АВ, или (b) присоединение к сульфгидрильным группам АВ, или (с) присоединение к аминогруппам АВ, или (d) присоединение к карбоксилатным группам АВ. В соответствии с описанием, АВ можно ковалентно присоединять к средству посредством промежуточного линкера, обладающего по меньшей мере двумя реакционноспособными группами, одной для реакции с АВ и одной для реакции со средством. Линкер, который может включать в себя любое совместимое органическое соединение, можно выбирать таким образом, что реакция с АВ (или средством) не оказывает неблагоприятного воздействия на реакционную способность и избирательность АВ. Кроме того, присоединение линкера к средству может не нарушать активность средства. Пригодные линкеры для реакции с окисленными антителами или окисленными фрагментами антител включают в себя линкеры, содержащие амин, выбранный из группы, состоящей из групп первичного амина, вторичного амина, гидразина, гидразида, гидроксилamina, фенилгидразина, семикарбазида и тиосемикарбазида. Такие реакционноспособные функциональные группы могут существовать как часть структуры линкера, или их можно вводить посредством подходящей химической модификации линкеров, не содержащих таких групп.

В соответствии с настоящим описанием пригодные линкеры для присоединения восстановленных АВ, включают в себя линкеры, содержащие реакционноспособные группы, способные к реакции с сульфгидрильной группой восстановленного антитела или фрагмента. Такие реакционноспособные группы включают в себя, но без ограничения реакционноспособные галоалкильные группы (включая, например, галоацетильные группы), п-ртутьбензоатные группы и группы, способные к реакциям присоединения Михаэля (включая, например, малеинимиды и группы типа, описанного в Mitra and Lawton, 1979, J. Amer. Chem. Soc. 101: 3097-3110).

В соответствии с настоящим описанием пригодные линкеры для присоединения к ни окисленным, ни восстановленным АВ, включают в себя линкеры, обладающие определенными функциональными группами, способными к реакции с первичными аминогруппами, присутствующими на немодифицированных остатках лизина в АВ. Такие реакционноспособные группы включают в себя, но без ограничения, карбоксильные или карбоновые сложные эфиры NHS, карбоксильные или карбоновые сложные эфиры сульфо-NHS, карбоксильные или карбоновые сложные эфиры 4-нитрофенила, карбоксильные или карбоновые сложные эфиры пентафторфенила, ацилимидазолы, изоцианаты и изотиоцианаты.

В соответствии с настоящим описанием пригодные линкеры для присоединения к ни окисленным, ни восстановленным АВ, включают в себя линкеры, обладающие конкретными функциональными группами, способными к реакции с группами карбоновой кислоты, присутствующими в остатках аспартата или глутамата в АВ, активированных с использованием пригодных реагентов. Пригодные активирующие реагенты включают в себя EDC, с добавлением или без добавления NHS или сульфо-NHS, и другие дегидратирующие средства, используемые для формирования карбоксамида. В этих случаях функциональные группы, присутствующие в пригодных линкерах, могут включать в себя первичные и вторичные амины, гидразины, гидроксиламины и гидразиды.

Средство можно присоединять к линкеру до или после того, как линкер присоединяют к АВ. При конкретных применениях может являться желательным сначала получить промежуточное соединение АВ-линкер, в котором линкер является свободным от ассоциированного средства. В зависимости от конкретного применения конкретное средство можно ковалентно присоединять к линкеру. В некоторых вариантах осуществления АВ сначала присоединяют к ММ, СМ и ассоциированным линкерам и затем присоединяют к линкеру для целей конъюгации.

Разветвленные линкеры:

В конкретных вариантах осуществления, используют разветвленные линкеры, обладающие множеством участков для присоединения средств. Для линкеров со множеством участков, одно ковалентное присоединение к АВ может приводить к промежуточному соединению АВ-линкер, способному связывать средство в нескольких участках. Участки могут представлять собой альдегидные или сульфгидрильные группы, или любой химический участок, к которому можно присоединять средства.

В некоторых вариантах осуществления более высокой специфической активности (или более высокого соотношения средств к АВ) можно достигать посредством присоединения линкера с одним участком во множестве участков на АВ. Это множество участков можно вводить в АВ любым из двух способов. Во-первых, можно получать множество альдегидных групп и/или сульфгидрильных групп в одном и том же АВ. Во-вторых, можно присоединять к альдегиду или сульфгидрилу АВ "разветвленный линкер", обладающий множеством функциональных участков для последующего присоединения к линкерам. Функциональные участки разветвленного линкера или линкера с множеством участков могут представлять собой альдегидные или сульфгидрильные группы, или могут представлять собой любые химические участки, к которым можно присоединять линкеры. Еще более высокую специфическую активность можно получать посредством комбинации этих двух способов, т.е., присоединения линкеров со множеством участков в нескольких участках на АВ.

Расщепляемые линкеры:

Пептидные линкеры, являющиеся чувствительными к расщеплению ферментами системы компле-

мента, такими как, но без ограничения, у-активатор плазминогена, тканевой активатор плазминогена, трипсин, плазмин или другой фермент, обладающий протеолитической активностью, можно использовать в одном варианте осуществления по настоящему описанию. В соответствии с одним способом по настоящему описанию средство присоединяют посредством линкера, чувствительного к расщеплению посредством комплемента. Антитело выбирают из класса, который может активировать комплемент. Конъюгат антитело-средство, таким образом, активирует каскад реакций комплемента и высвобождает средство в участке-мишени. В соответствии с другим способом по настоящему описанию средство присоединяют посредством линкера, чувствительного к расщеплению ферментами, обладающими протеолитической активностью, такими как у-активатор плазминогена, тканевой активатор плазминогена, плазмин или трипсин. Эти расщепляемые линкеры можно использовать в конъюгированных активируемых антителах, содержащих внеклеточный токсин, например, в качестве неограничивающего примера, любой из внеклеточных токсинов, показанных в табл. 5.

Неограничивающие примеры расщепляемых последовательностей линкеров представлены в табл. 6.

Таблица 6. Иллюстративные последовательности линкеров для конъюгации
Типы расщепляемых последовательностей

Аминокислотная последовательность

Расщепляемые плазмином последовательности

Проурокиназа	PRFKIIGG (SEQ ID NO: 615) PRFRIIGG (SEQ ID NO: 616)
TGFβ	SSRHRRALD (SEQ ID NO: 617)
Плазминоген	RKSSIIIRMRDVVL (SEQ ID NO: 618)
Стафилокиназа	SSSFDKGGYKGGDDA (SEQ ID NO: 619) SSSFDKGGYKGGDDA (SEQ ID NO: 620)

Расщепляемые фактором Ха последовательности

IEGR (SEQ ID NO: 621)
IDGR (SEQ ID NO: 622)
GGSIDGR (SEQ ID NO: 623)

Расщепляемые MMP последовательности

Желатиназа А PLGLWA (SEQ ID NO: 624)

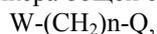
Расщепляемые коллагеназой последовательности

Коллаген кожи теленка (цепь α1(I))	GPQGIAGQ (SEQ ID NO: 625)
Коллаген кожи теленка (цепь α2(I))	GPQGLLGA (SEQ ID NO: 626)
Коллаген бычьего хряща (цепь α1(II))	GIAGQ (SEQ ID NO: 627)
Коллаген печени человека (цепь α1(III))	GPLGIAGI (SEQ ID NO: 628)
α ₂ M человека	GPEGLRVG (SEQ ID NO: 629)
P2P человека	YGAGLGVV (SEQ ID NO: 630) AGLGVVER (SEQ ID NO: 631) AGLGISSST (SEQ ID NO: 632)
α ₁ M крысы	EPQALAMS (SEQ ID NO: 633) QALAMSAI (SEQ ID NO: 634)
α ₂ M крысы	AAVHLSQ (SEQ ID NO: 635) MDAFLESS (SEQ ID NO: 636)
α ₁ I ₃ (2J) крысы	ESLPVVAV (SEQ ID NO: 637)
α ₁ I ₃ (27J) крысы	SAPAVESE (SEQ ID NO: 638)
Коллагеназа фибробластов человека (аутолитическое расщепление)	DVAQFVLT (SEQ ID NO: 639) VAQFVLTE (SEQ ID NO: 640) AQFVLTEG (SEQ ID NO: 641) PVQFVIGPQ (SEQ ID NO: 642)

Кроме того, средства можно присоединять посредством дисульфидных связей (например, дисульфидных связей на молекуле цистеина) с АВ. Поскольку многие опухоли естественным образом высвобождают высокие уровни глутатиона (восстанавливающего средства), это может восстанавливать дисульфидные связи с последующим высвобождением средства в участке доставки. В некоторых вариантах осуществления, восстанавливающее средство, которое может модифицировать СМ, может модифицировать также линкер конъюгированного активируемого антитела.

Спейсерные и расщепляемые элементы:

В некоторых вариантах осуществления может являться необходимым конструировать линкер таким образом, чтобы оптимизировать расстояние между средством и АВ активируемого антитела. Это можно осуществлять посредством использования линкера общей структуры:



где W представляет собой либо --NH--CH₂--, либо --CH₂--;

Q представляет собой аминокислоту, пептид и

n представляет собой целое число от 0 до 20.

В некоторых вариантах осуществления линкер может содержать спейсерный элемент и расщепляемый элемент. Спейсерный элемент служит для расположения расщепляемого элемента вдали от сердцевины АВ, так что расщепляемый элемент является более доступным для фермента, ответственного за расщепление. Конкретные разветвленные линкеры, описанные выше, могут служить в качестве спейсерных элементов.

На протяжении этого описания следует понимать, что присоединение линкера к средству (или

спейсерного элемента к расщепляемому элементу, или расщепляемого элемента к средству) не обязательно должно представлять собой конкретный способ присоединения или реакцию. Любая реакция, обеспечивающая продукт подходящей стабильности и биологической совместимости, является приемлемой.

Комплемент сыворотки и выбор линкеров:

В соответствии с одним способом по настоящему описанию, когда высвобождение средства является желательным, используют АВ, представляющее собой антители класса, который может активировать комплемент. Полученный конъюгат сохраняет способность как связывать антиген, так и активировать каскад реакций комплемента. Таким образом, в соответствии с этим вариантом осуществления по настоящему описанию, средство присоединяют к одному концу расщепляемого линкера или расщепляемого элемента, и другой конец линкерной группы присоединяют к специфическому участку на АВ. Например, если средство обладает гидроксигруппой или аминогруппой, его можно присоединять к карбокси-концу пептида, аминокислоты или другого подходящим образом выбранного линкера посредством сложноэфирной или амидной связи, соответственно. Например, такие средства можно присоединять к линкерному пептиду посредством карбодимидной реакции. Если средство содержит функциональные группы, которые могут мешать присоединению к линкеру, эти мешающие функциональные группы можно блокировать перед присоединением и разблокировать после получения конъюгата продукта или промежуточного соединения. Противоположный аминоконец линкера затем используют либо напрямую, либо после дополнительной модификации, для связывания с АВ, способным активировать комплемент.

Линкеры (или спейсерные элементы линкеров) могут иметь любую желательную длину, один их конец можно ковалентно присоединять к специфическим участкам на АВ активируемого антитела. Другой конец линкера или спейсерного элемента можно присоединять к аминокислоте или пептидному линкеру.

Таким образом, когда эти конъюгаты связывают антиген в присутствии комплемента, амидная или сложноэфирная связь, присоединяющая средство к линкеру, расщепляется, приводя к высвобождению средства в его активной форме. Эти конъюгаты при введении субъекту могут осуществлять доставку и высвобождение средства в участке-мишени и являются особенно эффективными для доставки *in vivo* лекарственных средств, антибиотиков, антиметаболитов, антипролиферативных средств и т.п., как представлено, но без ограничения, в табл. 5.

Линкеры для высвобождения без активации комплемента:

В другом применении направленной доставки, является желательным высвобождение средства без активации комплемента, поскольку активация каскада реакций комплемента в конечном счете может лизировать клетку-мишень. Таким образом, этот способ можно использовать, когда доставку и высвобождение средства необходимо выполнить без уничтожения клетки-мишени. Такова цель, если является желательной доставка клеточных медиаторов, таких как гормоны, ферменты, кортикостероиды, нейротрансмиттеры, гены или ферменты, в клетки-мишени. Эти конъюгаты можно получать посредством присоединения средства к АВ, не способному активировать комплемент, посредством линкера, слабо чувствительного к расщеплению сывороточными протеазами. Когда этот конъюгат вводят индивидууму, комплексы антиген-антитело образуются быстро, в то время как расщепление средства происходит медленно, что, таким образом, приводит к высвобождению в участке-мишени.

Биохимические перекрестно сшивающие средства:

В некоторых вариантах осуществления, активируемое антитело можно конъюгировать с одним или несколькими лекарственными средствами с использованием конкретных биохимических перекрестно сшивающих средств. Перекрестно-сшивающие реагенты формируют молекулярные мостики, связывающие функциональные группы двух различных молекул. Для связывания двух различных белков ступенчатым способом, можно использовать гетеробифункциональные перекрестно-сшивающие линкеры, включающие образование нежелательного гомополимера.

Можно использовать также пептидные линкеры, расщепляемые лизосомальными протеазами, например, Val-Cit, Val-Ala или другие дипептиды. Кроме того, можно использовать неустойчивые к кислотам линкеры, расщепляемые в окружении низкого pH лизосомы, например: бис-сиалиловый эфир. Другие пригодные линкеры включают в себя неустойчивые к катепсину субстраты, в частности, обладающие оптимальными функциями при кислом pH.

Иллюстративные гетеробифункциональные перекрестно-сшивающие средства приведены в табл. 7.

Таблица 7. Иллюстративные гетеробифункциональные перекрестно-сшивающие средства

Линкер	Реакционная способность	Преимущества и применения	Длина спейсерного плеча после перекрестного сшивания (Ангстрем)
SMPT	Первичные амины Сульфгидрилы	Большая стабильность	11,2 Å
SPDP	Первичные амины Сульфгидрилы	Тиолирование Расщепляемое перекрестное сшивание	6,8 Å
LC-SPDP	Первичные амины	Удлиненное спейсерное плечо	15,6 Å
Сульфо-LC-SPDP	Сульфгидрилы Первичные амины	Удлиненное спейсерное плечо	15,6 Å
SMCC	Сульфгидрилы Первичные амины	Водорастворимый Стабильная реакционноспособная группа малеинимида	11,6 Å
Сульфо-SMCC	Сульфгидрилы Первичные амины	Конъюгация фермент-антитело Конъюгация гаптен-белок-носитель	11,6 Å
MBS	Первичные амины Сульфгидрилы	Стабильная реакционноспособная группа малеинимида Водорастворимый	9,9 Å
Сульфо-MBS	Первичные амины Сульфгидрилы	Конъюгация фермент-антитело Конъюгация гаптен-белок-носитель	9,9 Å
SIAB	Первичные амины	Водорастворимый	10,6 Å
Сульфо-SIAB	Сульфгидрилы Первичные амины Сульфгидрилы	Конъюгация фермент-антитело	10,6 Å
SMPB	Первичные амины	Водорастворимый	14,5 Å
Сульфо-SMPB	Сульфгидрилы Первичные амины	Удлиненное спейсерное плечо Конъюгация фермент-антитело	14,5 Å
EDE/Сульфо-NHS	Сульфгидрилы Первичные амины	Удлиненное спейсерное плечо	0
ABN	Карбоксильные группы Углеводы Неизбирательная	Водорастворимый Конъюгация гаптен-носитель Реакция с сахарными группами	11,9 Å

Нерасщепляемые линкеры или прямое присоединение:

В некоторых вариантах осуществления по этому описанию можно конъюгировать конъюгат, так чтобы доставлять средство к мишени, но не высвободить. Это можно осуществлять посредством присоединения средства к АВ либо напрямую, либо посредством нерасщепляемого линкера.

Эти нерасщепляемые линкеры могут включать в себя аминокислоты, пептиды, D-аминокислоты или другие органические соединения, которые можно модифицировать с включением функциональных групп, которые затем можно использовать для присоединения к АВ способами, описанными в настоящем документе. Общая формула для такого органического линкера может представлять собой



где

W представляет собой либо --NH--CH₂--, либо --CH₂--;

Q представляет собой аминокислоту, пептид и

n представляет собой целое число от 0 до 20.

Нерасщепляемые конъюгаты:

В некоторых вариантах осуществления соединение можно присоединять к АВ, которые не активируют комплемент. При использовании АВ, неспособных к активации комплемента, это присоединение можно осуществлять с использованием линкеров, чувствительных к расщеплению посредством активированного комплемента, или с использованием линкеров, не чувствительных к расщеплению посредством активированного комплемента.

Антитела, описанные в настоящем документе, можно также составлять в форме иммунолипосом. Липосомы, содержащие антитело, получают способами, известными в данной области, такими как описанные в Epstein et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82: 3688 (1985); Hwang et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77: 4030 (1980) и Патента США № 4485045 и 4544545. Липосомы с увеличенным временем циркуляции описаны в Патенте США № 5013556.

Особенно пригодные липосомы можно получать способом обращенно-фазового испарения из ли-

пидной композиции, содержащей фосфатидилхолин, холестерин и PEG-derivатизированный фосфатидилэтаноламин (PEG-PE). Липосомы экструдируют через фильтры с определенным размером пор для получения липосом желательного диаметра. Фрагменты Fab' антитела по настоящему описанию можно конъюгировать с липосомами, как описано в Martin et al., J. Biol. Chem., 257: 286-288 (1982), посредством реакции дисульфидного обмена.

Определения:

Если не определено иначе, научные и технические термины, используемые в связи с настоящим описанием, должны иметь значения, являющиеся общепринятыми для специалиста в данной области. Термин объект с неопределенным артиклем "a" или "an" относится к одному или нескольким таким объектам. Например, соединение относится к одному или нескольким соединениям. Поэтому, термины "a", "an", "один или несколько" и "по меньшей мере один" можно использовать взаимозаменяемо. Кроме того, если контекст не требует иного, термины в единственном числе должны включать множественное число, и термины во множественном числе должны включать единственное число. В общем, номенклатура, используемая в связи с культивированием клеток и тканей, молекулярной биологией, и химией и гибридизацией белков и олиго- или полинуклеотидов, и в их способах, описанная в настоящем документе, является хорошо известной и общепринятой в данной области. Стандартные способы используют для рекомбинантной ДНК, синтеза олигонуклеотидов, и культивирования и трансформации тканей (например, электропорацию, липофекцию). Ферментативные реакции и способы очистки осуществляют в соответствии с инструкциями производителя или как является общепринятым в данной области, или как описано в настоящем документе. Вышеупомянутые способы и процедуры обычно проводят в соответствии с общепринятыми способами, как хорошо известно в данной области, и как описано в различных и более специализированных ссылках, упомянутых и обсуждаемых на протяжении настоящего описания. См., например, Sambrook et al. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2d ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989)). Номенклатура, используемая в связи с аналитической химией, синтетической органической химией, и медицинской и фармацевтической химией, и в их лабораторных процедурах и способах, описанная в настоящем документе, является хорошо известной и общепринятой в данной области. Стандартные способы используют для химического синтеза, химических анализов, фармацевтических препаратов, составов и доставки, и лечения пациентов.

Как применяют в соответствии с настоящим описанием, следующие термины, если не указано иначе, следует понимать как имеющие следующие значения:

Как применяют в настоящем документе, термин "антитело" относится к молекулам иммуноглобулинов и иммунологически активным частям молекул иммуноглобулинов (Ig), т.е., молекулам, содержащим антигенсвязывающий участок, специфически связывающий антиген (иммунореактивный по отношению к антигену). Под "специфически связывает" или "иммунореактивный по отношению к" или "иммуноспецифически связывает" означает, что антитело вступает в реакцию с одной или несколькими антигенными детерминантами желательного антигена и не вступает в реакцию с другими полипептидами или связывается с ними с намного более низкой аффинностью ($K_d > 10^{-6}$). Антитела включают в себя, но без ограничения, поликлональные, моноклональные, химерные, доменное антитело, отдельную цепь, Fab и фрагменты F(ab')₂, scFvs и экспрессирующую библиотеку Fab.

Известно, что базовая структурная единица антитела содержит тетрамер. Каждый тетрамер состоит из двух идентичных пар полипептидных цепей, где каждая пара содержит одну "легкую" (приблизительно 25 кДа) и одну "тяжелую" цепь (приблизительно 50-70 кДа). Аминоконцевая часть каждой цепи содержит вариабельную область из приблизительно 100-110 или более аминокислот, в первую очередь ответственных за узнавание антигена. Карбоксиконцевая часть каждой цепи определяет константную область, в первую очередь ответственную за эффекторную функцию. Как правило, молекулы антител, полученных от человека, относятся к любому из классов IgG, IgM, IgA, IgE и IgD, которые отличаются друг от друга по характеру тяжелой цепи, присутствующей в молекуле. Конкретные классы имеют также подклассы, такие как IgG₁, IgG₂ и другие. Более того, у человека, легкая цепь может представлять собой цепь каппа или цепь ламбда.

Термин "моноклональное антитело" (mAb) или "композиция моноклонального антитела", как применяют в настоящем документе, относится к популяции молекул антитела, содержащей только одну молекулярную разновидность молекул антитела, состоящую из уникального продукта гена легкой цепи и уникального продукта гена тяжелой цепи. В частности, определяющие комплементарность области (CDR) моноклонального антитела являются идентичными у всех молекул популяции. mAb содержат антигенсвязывающий участок, способный к иммунной реакции с конкретным эпитопом антигена, характеризующейся уникальной аффинностью связывания с ним.

Термин "антигенсвязывающий участок" или "связывающая часть" относится к части молекулы иммуноглобулина, которая участвует в связывании антигена. Антигенсвязывающий участок сформирован аминокислотными остатками N-концевых вариабельных ("V") областей тяжелой ("H") и легкой ("L") цепей. Три высоко разнообразных фрагмента внутри V областей тяжелой и легкой цепей, обозначенные как "гипервариабельные области", расположены между консервативными фланкирующими фрагментами, известными как "каркасные области" или "FR". Таким образом, термин "FR" относится к аминокис-

кислотным последовательностям, которые обнаружены в природе между гипервариабельными областями иммуноглобулинов и рядом с ними. В молекуле антитела, три гипервариабельные области легкой цепи и три гипервариабельные области тяжелой цепи расположены по отношению друг к другу в трехмерном пространстве таким образом, чтобы формировать антигенсвязывающую поверхность.

Антигенсвязывающая поверхность является комплементарной трехмерной поверхности связанного антигена, и три гипервариабельные области каждой из тяжелой и легкой цепей обозначены как "определяющие комплементарность области", или "CDR". Отнесение аминокислот к каждому из доменов осуществляется в соответствии с определениями по Rabat Sequences of Proteins of Immunological Interest (National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1987 и 1991)) или Chothia & Lesk J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987), Chothia et al. Nature 342:878-883 (1989).

Как применяют в настоящем документе, термин "эпитоп" включает в себя любую белковую детерминанту, способную специфически связываться с иммуноглобулином, scFv или T-клеточным рецептором. Термин "эпитоп" включают в себя любую белковую детерминанту, способную специфически связываться с иммуноглобулином или T-клеточным рецептором. Эпитопные детерминанты обычно состоят из химически активных поверхностных группировок молекул, таких как аминокислоты или боковые цепи Сахаров, и обычно обладают специфическими трехмерными структурными характеристиками, а также специфическими характеристиками заряда. Например, антитела могут образовываться против N-концевых или C-концевых пептидов полипептида. Говорят, что антитело специфически связывает антиген, когда константа диссоциации составляет ≤ 1 мкМ; в некоторых вариантах осуществления ≤ 100 нМ и в некоторых вариантах осуществления, ≤ 10 нМ.

Как применяют в настоящем документе, термины "специфическое связывание", "иммунологическое связывание", и "свойства иммунологического связывания" относятся к нековалентным взаимодействиям того типа, который возникает между молекулой иммуноглобулина и антигеном, для которого иммуноглобулин является специфическим. Силу, или аффинность взаимодействий иммунологического связывания можно выражать в отношении константы диссоциации (K_d) взаимодействия, где меньшая K_d представляет большую аффинность. Свойства иммунологического связывания выбранных полипептидов можно оценивать количественно с использованием способов, хорошо известных в данной области. Один из таких способов включает измерение скоростей образования и диссоциации комплекса антигенсвязывающий участок/антиген, где эти скорости зависят от концентраций партнеров по комплексу, аффинности взаимодействия и геометрических параметров, в равной степени влияющих на скорость в обоих направлениях. Таким образом, как "константу скорости связывания" (K_{on}), так и "константу скорости диссоциации" (K_{off}) можно определять посредством расчета концентраций и фактических скоростей связывания и диссоциации. (См. Nature 361:186-87 (1993)). Отношение K_{off}/K_{on} позволяет устранить все параметры, не связанные с аффинностью, и равно константе диссоциации K_d . (См., в общем, Davies et al. (1990) Annual Rev Biochem 59:439-473). Говорят, что антитело по настоящему описанию специфически связывается с мишенью, когда константа связывания (K_d) составляет ≤ 1 мкМ, в некоторых вариантах осуществления ≤ 100 нМ, в некоторых вариантах осуществления ≤ 10 нМ, и в некоторых вариантах осуществления от ≤ 100 пМ до приблизительно 1 пМ, как измерено посредством таких анализов, как анализы связывания радиоактивных лигандов или подобные анализы, известные специалистам в данной области.

Термин "выделенный полинуклеотид", как применяют в настоящем документе, должен обозначать полинуклеотид геномного, кДНК или синтетического происхождения или некоторые их комбинации, где в силу своего происхождения "выделенный полинуклеотид" (1) не ассоциирован со всем или частью полинуклеотида, в котором "выделенный полинуклеотид" обнаружен в природе, (2) функционально связан с полинуклеотидом, с которым он не связан в природе, или (3) не встречается в природе в качестве части большей последовательности. Полинуклеотиды в соответствии с описанием включают в себя молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие тяжелую цепь молекул иммуноглобулинов, показанных в настоящем документе, и молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие легкую цепь молекул иммуноглобулинов, показанных в настоящем документе.

Термин "выделенный белок", упомянутый в настоящем документе, обозначает белок с кДНК, рекомбинантной РНК или синтетического происхождения, или некоторые их комбинации, где в силу своего происхождения или источника получения, "выделенный белок" (1) не ассоциирован с белками, обнаруженными в природе, (2) является свободным от других белков из этого же источника, например, свободным от мышинных белков, (3) экспрессируется клетками из другого вида, или (4) не встречается в природе.

Термин "полипептид" применяют в настоящем документе в качестве общего термина для обозначения нативного белка, фрагментов или аналогов полипептидной последовательности. Таким образом, фрагменты и аналоги нативного белка являются видами из рода полипептидов. Полипептиды в соответствии с описанием содержат тяжелую цепь молекул иммуноглобулинов, показанных в настоящем документе, и легкую цепь молекул иммуноглобулинов, показанных в настоящем документе, так же как молекулы антител, образованные комбинациями, содержащими тяжелую цепь молекул иммуноглобулинов с легкой цепью молекул иммуноглобулинов, таких как легкая цепь каппа молекул иммуноглобулинов, и

наоборот, так же как их фрагменты и аналоги.

Термин "природный", как применяют в настоящем документе по отношению к объекту, относится к тому факту, что объект можно обнаружить в природе. Например, полипептидная или полинуклеотидная последовательность, присутствующая в организме (включая вирусы), которая может быть выделена из природного источника и которая не была целенаправленно модифицирована человеком в лаборатории или иначе, является встречающейся в природе.

Термин "функционально связанный", как применяют в настоящем документе, относится к расположению описываемых таким образом компонентов в такой взаимосвязи, которая позволяет им функционировать предназначенным для них образом. Контрольную последовательность, "функционально связанную" с кодирующей последовательностью, лигируют таким образом, что экспрессия кодирующей последовательности происходит в условиях, совместимых с контрольными последовательностями.

Термин "контрольная последовательность", как применяют в настоящем документе, относится к полинуклеотидным последовательностям, необходимым для осуществления экспрессии и процессинга кодирующих последовательностей, с которыми они лигированы. Природа таких контрольных последовательностей различается в зависимости от организма-хозяина: у прокариот такие контрольные последовательности, как правило, включают в себя промотор, участок связывания рибосомы, и последовательность терминации транскрипции, у эукариот, как правило, такие контрольные последовательности включают в себя промоторы и последовательность терминации транскрипции. Термин "контрольные последовательности" предназначен для обозначения, как минимум, всех компонентов, присутствие которых является необходимым для экспрессии и процессинга, и может также включать дополнительные компоненты, присутствие которых обеспечивает преимущество, например, лидерные последовательности и последовательности партнеров по слиянию. Термин "полинуклеотид", как упомянуто в настоящем документе, обозначает нуклеотиды длиной по меньшей мере 10 оснований, либо рибонуклеотиды, либо дезоксирибонуклеотиды, либо модифицированную форму любого типа нуклеотида. Термин включает в себя одно- и двухцепочечные формы ДНК.

Термин олигонуклеотид, как упомянуто в настоящем документе, включает в себя природные и модифицированные нуклеотиды, соединенные друг с другом природными и неприродными олигонуклеотидными связями. Олигонуклеотиды представляют собой подгруппу полинуклеотидов, как правило, имеющих длину 200 оснований или менее. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотиды имеют длину 10-60 оснований, и в некоторых вариантах осуществления, длину 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20-40 оснований. Олигонуклеотиды, как правило, являются одноцепочечными, например, для зондов, хотя олигонуклеотиды могут являться двухцепочечными, например, для применения в конструировании генного мутанта. Олигонуклеотиды по этому описанию являются смысловыми или бессмысловыми олигонуклеотидами.

Термин "природные нуклеотиды", как упомянуто в настоящем документе, включает в себя дезоксирибонуклеотиды и рибонуклеотиды. Термин "модифицированные нуклеотиды", как упомянуто в настоящем документе, включает в себя нуклеотиды с модифицированными или замещенными сахарными группами и т.п. Термин "олигонуклеотидные связи", как упомянуто в настоящем документе, включает в себя олигонуклеотидные связи, такие как фосфоротиоатные, фосфородитиоатные, фосфороселеноатные, фосфородиселеноатные, фосфороанилотиоатные, фосфоранилататные, фосфороимидатные и т.п. См., например, LaPlanche et al. Nucl. Acids Res. 14:9081 (1986); Stec et al. J. Am. Chem. Soc. 106:6077 (1984), Stein et al. Nucl. Acids Res. 16:3209 (1988), Zon et al. Anti Cancer Drug Design 6:539 (1991); Zon et al. Oligonucleotides and Analogues: A Practical Approach, pp. 87-108 (F. Eckstein, Ed., Oxford University Press, Oxford England (1991)); Stec et al. Патент США № 5151510; Uhlmann and Peyman Chemical Reviews 90: 543 (1990). Олигонуклеотид может включать метку для детекции, если желательно.

Как применяют в настоящем документе, двадцать общераспространенных аминокислот и их сокращенные обозначения соответствуют общепринятому применению. См. Immunology - A Synthesis (2nd Edition, E.S. Golub and D.R. Green, Eds., Sinauer Associates, Sunderland, Mass. (1991)). Стереоизомеры (например, D-аминокислоты) двадцать общераспространенных аминокислот, неприродные аминокислоты, такие как α -, α -дизамещенные аминокислоты, N-алкиламино кислоты, молочная кислота и другие необычные аминокислоты также могут являться пригодными компонентами полипептидов по настоящему описанию. Примеры необычных аминокислот включают в себя 4 гидроксипролин, γ -карбоксиглутамат, ϵ -N,N,N-триметиллизин, ϵ -N-ацетиллизин, O-фосфосерин, N-ацетилсерин, N-формилметионин, 3-метилгистидин, 5-гидроксилизин, σ -N-метиларгинин и другие подобные аминокислоты и иминокислоты (например, 4-гидроксипролин). В аннотации полипептидов, применяемой в настоящем документе, направление влево является направлением к аминоконцу, и направление вправо является направлением к карбоксиконцу, в соответствии со стандартным применением и условными обозначениями.

Подобным образом, если не указано иначе, левый конец одноцепочечной полинуклеотидной последовательности является 5'-концом, направление влево двухцепочечной полинуклеотидной последовательности обозначено 5'-направлением. Направление присоединения от 5' к 3' растущих транскриптов РНК обозначено как направление транскрипции. Области последовательности цепи ДНК, обладающие

такой же последовательностью, что и РНК, и расположенные к 5' от 5'-конца транскрипта РНК, обозначены как "вышележащие последовательности", области последовательности цепи ДНК, обладающие такой же последовательностью, что и РНК, и расположенные к 3' от 3'-конца транскрипта РНК, обозначены как "нижележащие последовательности".

Применительно к полипептидам термин "значительная идентичность" означает, что две пептидные последовательности при оптимальном выравнивании, например, посредством программы GAP или BESTFIT с использованием штрафов за пропуски по умолчанию, разделяют по меньшей мере 80-процентную идентичность последовательностей, в некоторых вариантах осуществления по меньшей мере 90-процентную идентичность последовательностей, в некоторых вариантах осуществления по меньшей мере 95-процентную идентичность последовательностей и в некоторых вариантах осуществления по меньшей мере 99-процентную идентичность последовательностей.

В некоторых вариантах осуществления остатки в положениях, не являющихся идентичными, отличаются консервативными аминокислотными заменами.

Как обсуждают в настоящем документе, незначительные изменения аминокислотных последовательностей молекул антител или иммуноглобулинов предусмотрены, как охватываемые настоящим описанием, при условии, что варианты аминокислотной последовательности сохраняют по меньшей мере 75%, в некоторых вариантах осуществления по меньшей мере 80%, 90%, 95% и в некоторых вариантах осуществления 99%. В частности, предусмотрены консервативные аминокислотные замены.

Консервативными заменами являются те, которые происходят в пределах семейства аминокислот, родственных по их боковым цепям. Генетически кодированные аминокислоты в общем делят на семейства: (1) кислые аминокислоты представляют собой аспартат, глутамат; (2) основные аминокислоты представляют собой лизин, аргинин, гистидин; (3) неполярные аминокислоты представляют собой аланин, валин, лейцин, изолейцин, пролин, фенилаланин, метионин, триптофан и (4) незаряженные полярные аминокислоты представляют собой глицин, аспарагин, глутамин, цистеин, серин, треонин, тирозин. Гидрофильные аминокислоты включают в себя аргинин, аспарагин, аспартат, глутамин, глутамат, гистидин, лизин, серин и треонин. Гидрофобные аминокислоты включают в себя аланин, цистеин, изолейцин, лейцин, метионин, фенилаланин, пролин, триптофан, тирозин и валин. Другие семейства аминокислот включают в себя (i) серин и треонин, которые образуют алифатически-гидроксильное семейство; (ii) аспарагин и глутамин, которые образуют содержащее амид семейство; (iii) аланин, валин, лейцин и изолейцин, которые образуют алифатическое семейство; и (iv) фенилаланин, триптофан и тирозин, которые образуют ароматическое семейство. Например, разумно ожидать, что изолированная замена лейцина на изолейцин или валин, аспартата на глутамат, треонина на серин, или подобная замена аминокислоты на структурно родственную аминокислоту не будет оказывать значительного эффекта на связывание или свойства полученной молекулы, особенно, если замена не затрагивает аминокислоту в каркасном участке. Получен ли в результате замены аминокислоты функциональный пептид, можно легко определять посредством анализа специфической активности полипептидного производного. Анализы подробно описаны в настоящем документе. Фрагменты или аналоги молекул антител или иммуноглобулинов может легко получать специалист в данной области. Пригодные аминокислотные и карбоксиконцы фрагментов или аналогов расположены рядом с границами функциональных доменов. Структурные и функциональные домены можно идентифицировать посредством сравнения данных нуклеотидной и/или аминокислотной последовательности с общедоступными или находящимися в частной собственности базами данных последовательностей. В некоторых вариантах осуществления, компьютеризованные способы сравнения используют для идентификации мотивов последовательностей или предсказания конформационных доменов белка, присутствующих в других белках с известной структурой и/или функцией. Известны способы идентификации белковых последовательностей, которые укладываются в известную трехмерную структуру. Bowie et al. *Science* 253:164 (1991). Таким образом, приведенные выше примеры показывают, что специалист в данной области может распознавать мотивы последовательностей и структурные конформации, которые можно использовать для определения структурных и функциональных доменов в соответствии с описанием.

Пригодными аминокислотными заменами являются те, которые: (1) уменьшают чувствительность к протеолизу, (2) уменьшают чувствительность к окислению, (3) изменяют аффинность связывания при образовании белковых комплексов, (4) изменяют аффинность связывания и (5) придают или модифицируют другие физико-химические или функциональные свойства таких аналогов. Аналоги могут включать в себя различные мутации последовательности, отличные от встречающейся в природе пептидной последовательности. Например, единичные или множественные аминокислотные замены (например, консервативные аминокислотные замены) можно выполнять в природной последовательности (например, в части полипептида за пределами домена(доменов), образующих межмолекулярные контакты.

Консервативная аминокислотная замена не должна существенно изменять структурные характеристики исходной последовательности (например, замена аминокислоты не должна проявлять тенденцию к разрушению спирали, существующей в исходной последовательности, или разрушать другие типы вторичной структуры, характеризующих исходную последовательность). Примеры известных в данной области вторичных и третичных структур полипептидов описаны в *Proteins, Structures and Molecular Princi-*

ples (Creighton, Ed., W. H. Freeman and Company, New York (1984)); Introduction to Protein Structure (C. Branden и J. Tooze, eds., Garland Publishing, New York, N.Y. (1991)) и Thornton et al. Nature 354:105 (1991).

Термин "фрагмент полипептида", как применяют в настоящем документе, относится к полипептиду, который обладает аминоконцевой и/или карбоксиконцевой делецией, и/или одной или несколькими внутренней делецией(делециями), но в котором остальная аминокислотная последовательность является идентичной соответствующим положениям в природной последовательности, выведенной, например, из полномерной последовательности кДНК. Фрагменты, как правило, имеют длину по меньшей мере 5, 6, 8 или 10 аминокислот, в некоторых вариантах осуществления, длину по меньшей мере 14 аминокислот, в некоторых вариантах осуществления, длину по меньшей мере 20 аминокислот, обычно длину по меньшей мере 50 аминокислот, и в некоторых вариантах осуществления длину по меньшей мере 70 аминокислот. Термин "аналог", как применяют в настоящем документе, относится к полипептидам, состоящим из фрагмента из по меньшей мере 25 аминокислот, обладающим значительной идентичностью с частью выведенной аминокислотной последовательности и обладающим специфическим связыванием с мишенью, в подходящих для связывания условиях. Как правило, полипептидные аналоги содержат консервативную аминокислотную замену (или добавление или делецию) по отношению к встречающейся в природе последовательности. Аналоги, как правило, имеют длину по меньшей мере 20 аминокислот, в некоторых вариантах осуществления длину по меньшей мере 50 аминокислот или более и часто могут достигать в длину размера полномерного встречающегося в природе полипептида.

Термин "средство" применяют в настоящем документе для обозначения химического соединения, смеси химических соединений, биологической макромолекулы, или экстракта, полученного из биологических материалов.

Как применяют в настоящем документе, термины "метка" или "меченый" относятся к включению поддающегося детекции маркера, например, посредством включения радиоактивно меченной аминокислоты или присоединения к полипептиду биотинилированных групп, которые можно детектировать посредством меченого авидина (например, стрептавидина, обладающего флуоресцентным маркером или ферментативной активностью, которую можно детектировать посредством оптических или калориметрических способов). В конкретных ситуациях метка или маркер могут также являться терапевтическими. Разные способы мечения полипептидов и гликопротеинов известны в данной области и могут быть использованы. Примеры меток для полипептидов включают в себя, но без ограничения, следующие: радиоактивные изотопы или радионуклиды (например, ^3H , ^{14}C , ^{15}N , ^{35}S , ^{90}Y , ^{99}Tc , ^{111}In , ^{125}I , ^{131}I), флуоресцентные метки (например, FITC, родамин, лантаниды фосфора), ферментативные метки (например, пероксидаза хрена, β -галактозидаза, люцифераза, щелочная фосфатаза), хемилюминесцентные, биотинилированные группы, предопределенные полипептидные эпитопы, узнаваемые вторичным репортером (например, последовательности пары лейциновой молнии, участки связывания вторичных антител, связывающие металл домены, эпитопные метки). В некоторых вариантах осуществления метки присоединяют с помощью спейсерных плечей различной длины для уменьшения потенциальных стерических затруднений. Термин "фармацевтический агент или лекарственное средство", как применяют в настоящем документе, относится к химическому соединению или композиции, способным индуцировать желательный терапевтический эффект при надлежащем введении пациенту.

Другие химические термины в настоящем документе используют в соответствии с общепринятым в данной области применением, как проиллюстрировано в The McGraw-Hill Dictionary of Chemical Terms (Parker, S., Ed., McGraw-Hill, San Francisco (1985)).

Как применяют в настоящем документе, "в основном чистый" означает, целевые объекты являются преобладающими присутствующими объектами (т.е., в молярном отношении, они являются более многочисленными, чем любые другие индивидуальные объекты в композиции), и в некоторых вариантах осуществления, в основном очищенная фракция представляет собой композицию, где целевые объекты составляют по меньшей мере приблизительно 50% (в молярном отношении) от всех присутствующих макромолекулярных объектов.

Как правило, в основном чистая композиция содержит более, чем приблизительно 80% от всех макромолекулярных объектов, присутствующих в композиции, в некоторых вариантах осуществления более, чем приблизительно 85%, 90%, 95% и 99%. В некоторых вариантах осуществления целевые объекты очищены до, по существу, гомогенного состояния (загрязняющие объекты невозможно детектировать в композиции общепринятыми способами детекции), где композиция состоит в основном из одного вида макромолекулярных объектов.

Термин пациент включает в себя человека и ветеринарных субъектов.

Антитела и/или активируемые антитела по этому описанию специфически связывают данную мишень, например, человеческий белок-мишень, такой как CD71 человека. В это описание включены также антитела и/или активируемые антитела, связывающие тот же эпитоп, что и антитела и/или активируемые антитела, описанные в настоящем документе. В это описание включены также антитела и/или активируемые антитела, конкурирующие с антителом против CD71 и/или активируемым антителом против CD71, описанным в настоящем документе, за связывание с CD71, например, CD71 человека. В это описание включены также антитела и/или активируемые антитела, проявляющие перекрестную конкурен-

цию с антителом против CD71 и/или активируемым антителом против CD71, описанным в настоящем документе, за связывание с CD71, например, CD71 человека.

Специалисту в данной области понятно, что возможно определить, без излишнего экспериментирования, обладает ли моноклональное антитело (например, мышинное моноклональное или гуманизированное антитело) такой же специфичностью, что и моноклональное антитело, используемое в способах, описанных в настоящем документе, посредством проверки, предотвращает ли первое связывание последнего с мишенью. Если тестируемое моноклональное антитело конкурирует с моноклональным антителом по этому описанию, как показано по уменьшению связывания моноклонального антитела по этому описанию, тогда два моноклональных антитела связывают один и тот же, или близко родственной, эпитоп. Альтернативным способом определения того, обладает ли моноклональное антитело специфичностью моноклонального антитела по этому описанию, является предварительная инкубация моноклонального антитела по этому описанию с мишенью и затем добавление тестируемого моноклонального антитела для определения того, ингибирована ли способность тестируемого моноклонального антитела связывать мишень. Если тестируемое моноклональное антитело ингибировано, тогда, по всей вероятности, оно обладает такой же, или функционально эквивалентной, эпитопной специфичностью, что и моноклональные антитела по этому описанию.

Мультиспецифические активируемые антитела

Описание относится также к мультиспецифическим активируемым антителам против CD71. Мультиспецифические активируемые антитела, представленные в настоящем документе, представляют собой мультиспецифическое антитело, которые узнают CD71 и по меньшей мере один или более других антигенов или эпитопов, и которые содержат по меньшей мере одну маскирующую группу (ММ), связанную по меньшей мере с одним антигенсвязывающим или эпитопсвязывающим доменом мультиспецифического антитела, так что присоединение ММ уменьшает способность антигенсвязывающего или эпитопсвязывающего домена связывать его мишень. В некоторых вариантах осуществления ММ присоединяют к антигенсвязывающему или эпитопсвязывающему домену мультиспецифического антитела посредством расщепляемой группы (СМ), функционирующей в качестве субстрата по меньшей мере для одной протеазы. Активируемые мультиспецифические антитела, представленные в настоящем документе, являются стабильными в кровотоке, активируются в намеченных для терапии и/или диагностики участках, но не в нормальной, т.е., здоровой ткани, и, при активации, демонстрируют связывание с мишенью, по меньшей мере сравнимое со связыванием соответствующего, немодифицированного мультиспецифического антитела.

В некоторых вариантах осуществления мультиспецифические активируемые антитела разработаны для привлечения иммуноэффекторных клеток, они также обозначены в настоящем документе как привлекающие иммуноэффекторные клетки мультиспецифические активируемые антитела. В некоторых вариантах осуществления мультиспецифические активируемые антитела разработаны для привлечения лейкоцитов, они также обозначены в настоящем документе как привлекающие лейкоциты мультиспецифические активируемые антитела. В некоторых вариантах осуществления мультиспецифические активируемые антитела разработаны для привлечения Т-клеток, они также обозначены в настоящем документе как привлекающие Т-клетки мультиспецифические активируемые антитела. В некоторых вариантах осуществления мультиспецифические активируемые антитела привлекают поверхностный антиген на лейкоците, например на Т-клетке, на клетке естественного киллера (НК), на миелоидной мононуклеарной клетке, на макрофаге и/или на другой иммуноэффекторной клетке. В некоторых вариантах осуществления иммуноэффекторная клетка представляет собой лейкоцит. В некоторых вариантах осуществления иммуноэффекторная клетка представляет собой Т-клетку. В некоторых вариантах осуществления иммуноэффекторная клетка представляет собой клетку НК. В некоторых вариантах осуществления иммуноэффекторная клетка представляет собой мононуклеарную клетку, например миелоидную мононуклеарную клетку. В некоторых вариантах осуществления мультиспецифические активируемые антитела разработаны для связывания или взаимодействия иным образом с более, чем одной мишенью и/или с более, чем одним эпитопом, они также обозначены в настоящем документе как нацеленные на множество антигенов активируемые антитела. Как применяют в настоящем документе, термины "мишень" и "антиген" используют взаимозаменяемо.

В некоторых вариантах осуществления привлекающие иммуноэффекторные клетки мультиспецифические активируемые антитела по этому описанию содержат нацеливающее антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, связывающие CD71, и привлекающие иммуноэффекторные клетки антитело или его антигенсвязывающую часть, где по меньшей мере одно из нацеливающего антитела или его антигенсвязывающего фрагмента и/или привлекающего иммуноэффекторные клетки антитела или его антигенсвязывающей части замаскирован. В некоторых вариантах осуществления привлекающее иммуноэффекторные клетки антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит первое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент (АВ1), связывающее первую, привлекающую иммуноэффекторные клетки мишень, где АВ1 присоединен к маскирующей группе (ММ1) таким образом, что присоединение ММ1 уменьшает способность АВ1 связывать первую мишень. В некоторых вариантах осуществления нацеливающее антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит второе антитело или его фрагмент,

включающие в себя второе антитело или его антигенсвязывающий фрагмент (AB2), связывающие CD71, где AB2 присоединен к маскирующей группе (MM2) таким образом, что присоединение MM2 уменьшает способность AB2 связывать CD71. В некоторых вариантах осуществления привлекающее иммуоэффеторные клетки антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит первое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент (AB1), связывающие первую, привлекающую иммуоэффеторные клетки мишень, где AB1 присоединен к маскирующей группе (MM1) таким образом, что присоединение MM1 уменьшает способность AB1 связывать первую мишень, и нацеливающее антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит второе антитело или его фрагмент, включающие в себя второе антитело или его антигенсвязывающий фрагмент (AB2), связывающие CD71, где AB2 присоединен к маскирующей группе (MM2) таким образом, что присоединение MM2 уменьшает способность AB2 связывать CD71. В некоторых вариантах осуществления не привлекающее иммуоэффеторные клетки антитело представляет собой нацеленное на злокачественную опухоль антитело. В некоторых вариантах осуществления не являющееся эффетором иммуоцитов антитело представляет собой IgG. В некоторых вариантах осуществления, привлекающее иммуоэффеторные клетки антитело представляет собой scFv. В некоторых вариантах осуществления нацеленное на CD71 антитело (например, не являющееся эффетором иммуоцитов антитело) представляет собой IgG, и привлекающее иммуоэффеторные клетки антитело представляет собой scFv. В некоторых вариантах осуществления иммуоэффеторная клетка представляет собой лейкоцит. В некоторых вариантах осуществления иммуоэффеторная клетка представляет собой Т-клетку. В некоторых вариантах осуществления иммуоэффеторная клетка представляет собой клетку НК. В некоторых вариантах осуществления иммуоэффеторная клетка представляет собой миелоидную мононуклеарную клетку.

В некоторых вариантах осуществления привлекающие Т-клетки мультиспецифические активируемые антитела по этому описанию содержат нацеленное на CD71 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент и привлекающее Т-клетки антитело или его антигенсвязывающую часть, где по меньшей мере одно из нацеленного на CD71 антитело или его антигенсвязывающего фрагмента, и/или привлекающего Т-клетку антитела или его антигенсвязывающей части замаскирован. В некоторых вариантах осуществления привлекающее Т-клетки антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит первое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент (AB1), связывающие первую, привлекающую Т-клетки мишень, где AB1 присоединен к маскирующей группе (MM1) таким образом, что присоединение MM1 уменьшает способность AB1 связывать первую мишень. В некоторых вариантах осуществления нацеливающее антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит второе антитело или его фрагмент, включающие в себя второе антитело или его антигенсвязывающий фрагмент (AB2), связывающие CD71, где AB2 присоединен к маскирующей группе (MM2) таким образом, что присоединение MM2 уменьшает способность AB2 связывать CD71. В некоторых вариантах осуществления привлекающее Т-клетки антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит первое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент (AB1), связывающие первую, привлекающую Т-клетки мишень, где AB1 присоединен к маскирующей группе (MM1) таким образом, что присоединение MM1 уменьшает способность AB1 связывать первую мишень, и нацеливающее антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит второе антитело или его фрагмент, включающие в себя второе антитело или его антигенсвязывающий фрагмент (AB2), связывающие CD71, где AB2 присоединен к маскирующей группе (MM2) таким образом, что присоединение MM2 уменьшает способность AB2 связывать CD71.

В некоторых вариантах осуществления привлекающего иммуоэффеторные клетки мультиспецифического активируемого антитела, один антиген представляет собой CD71, и другой антиген представляет собой, как правило, стимулирующий или ингибирующий рецептор, присутствующий на поверхности Т-клетки, клетки естественного киллера (NK), миелоидной мононуклеарной клетки, макрофага и/или другой иммуоэффеторной клетки, такой как, но без ограничения, B7-H4, BTLA, CD3, CD4, CD8, CD16a, CD25, CD27, CD28, CD32, CD56, CD137, CTLA-4, GITR, HVEM, ICOS, LAG3, NKG2D, OX40, PD-1, TIGIT, TIM3 или VISTA. В некоторых вариантах осуществления, антиген представляет собой стимулирующий рецептор, присутствующий на поверхности Т-клетки или клетки НК; примеры таких стимулирующих рецепторов включают в себя, но без ограничения, CD3, CD27, CD28, CD137 (обозначенный также как 4-1BB), GITR, HVEM, ICOS, NKG2D и OX40. В некоторых вариантах осуществления, антиген представляет собой ингибирующий рецептор, присутствующий на поверхности Т-клетки; примеры таких ингибирующих рецепторов включают в себя, но без ограничения, BTLA, CTLA-4, LAG3, PD-1, TIGIT, TIM3, и экспрессируемые НК KIR. Домен антитела, придающий специфичность к поверхностному антигену Т-клетки можно также заменять на лиганд или домен лиганда, связывающий Т-клеточный рецептор, рецептор клетки НК, рецептор макрофага и/или рецептор другой иммуоэффеторной клетки, такой как, но без ограничения, B7-1, B7-2, B7H3, PDL1, PDL2 или TNFSF9.

В некоторых вариантах осуществления привлекающее Т-клетки мультиспецифическое активируемое антитело содержит scFv против CD3 эпсилон (CD3ε, также обозначаемый в настоящем документе как CD3ε и CD3) и нацеливающее антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, где по меньшей мере одно из scFv против CD3ε и/или нацеливающего антитела, или его антигенсвязывающей части замас-

кирован. В некоторых вариантах осуществления scFv против CD3ε содержит первое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент (AB1), связывающие CD3ε, где AB1 присоединен к маскирующей группе (MM1) таким образом, что присоединение MM1 уменьшает способность AB1 связывать CD3ε. В некоторых вариантах осуществления нацеливающее антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит второе антитело или его фрагмент, включающие в себя второе антитело или его антигенсвязывающий фрагмент (AB2), связывающие CD71, где AB2 присоединен к маскирующей группе (MM2) таким образом, что присоединение MM2 уменьшает способность AB2 связывать CD71. В некоторых вариантах осуществления scFv против CD3ε содержит первое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент (AB1), связывающие CD3ε, где AB1 присоединен к маскирующей группе (MM1) таким образом, что присоединение MM1 уменьшает способность AB1 связывать CD3ε, и нацеливающее антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит второе антитело или его фрагмент, включающие в себя второе антитело или его антигенсвязывающий фрагмент (AB2), связывающие CD71, где AB2 присоединен к маскирующей группе (MM2) таким образом, что присоединение MM2 уменьшает способность AB2 связывать CD71.

В некоторых вариантах осуществления нацеленные на множество антигенов антитела и/или нацеленные на множество антигенов активируемые антитела содержат по меньшей мере первое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, связывающие первую мишень и/или первый эпитоп, и второе антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, связывающие вторую мишень и/или второй эпитоп. В некоторых вариантах осуществления нацеленные на множество антигенов антитела и/или нацеленные на множество антигенов активируемые антитела связывают две или более различных мишени. В некоторых вариантах осуществления нацеленные на множество антигенов антитела и/или нацеленные на множество антигенов активируемые антитела связывают два или более различных эпитопа на одной и той же мишени. В некоторых вариантах осуществления нацеленные на множество антигенов антитела и/или нацеленные на множество антигенов активируемые антитела связывают комбинацию из двух или более различных мишеней и двух или более различных эпитопов на одной и той же мишени.

В некоторых вариантах осуществления мультиспецифическое активируемое антитело, содержащее IgG, обладает замаскированными вариabельными доменами IgG. В некоторых вариантах осуществления мультиспецифическое активируемое антитело, содержащее scFv, обладает замаскированными доменами scFv. В некоторых вариантах осуществления мультиспецифическое активируемое антитело обладает как вариabельными доменами IgG, так и доменами scFv, где по меньшей мере один из вариabельных доменов IgG присоединен к маскирующей группе. В некоторых вариантах осуществления мультиспецифическое активируемое антитело обладает как вариabельными доменами IgG, так и доменами scFv, где по меньшей мере один из доменов scFv присоединен к маскирующей группе. В некоторых вариантах осуществления мультиспецифическое активируемое антитело обладает как вариabельными доменами IgG, так и доменами scFv, где по меньшей мере один из вариabельных доменов IgG присоединен к маскирующей группе, и по меньшей мере один из доменов scFv присоединен к маскирующей группе. В некоторых вариантах осуществления мультиспецифическое активируемое антитело обладает как вариabельными доменами IgG, так и доменами scFv, где каждый из вариabельных доменов IgG и доменов scFv присоединен к своей собственной маскирующей группе. В некоторых вариантах осуществления один домен антитела из мультиспецифического активируемого антитела обладает специфичностью для антигена-мишени, и другой домен антитела обладает специфичностью для поверхностного антигена Т-клетки. В некоторых вариантах осуществления один домен антитела из мультиспецифического активируемого антитела обладает специфичностью для антигена-мишени и другой домен антитела обладает специфичностью для другого антигена-мишени. В некоторых вариантах осуществления один домен антитела из мультиспецифического активируемого антитела обладает специфичностью для эпитопа антигена-мишени и другой домен антитела обладает специфичностью для другого эпитопа антигена-мишени.

В мультиспецифическом активируемом антителе scFv можно сливать с карбокси-концом тяжелой цепи активируемого антитела IgG, с карбоксиконцом легкой цепи активируемого антитела IgG, или с карбокси-концами как тяжелой, так и легкой цепей активируемого антитела IgG. В мультиспецифическом активируемом антителе scFv можно сливать с аминоконцом тяжелой цепи активируемого антитела IgG, с аминоконцом легкой цепи активируемого антитела IgG или с аминоконцами как тяжелой, так и легкой цепей активируемого антитела IgG. В мультиспецифическом активируемом антителе scFv можно сливать с любой комбинацией одного или несколько карбоксиконцов и одного или нескольких аминоконцов активируемого антитела IgG. В некоторых вариантах осуществления маскирующая группа (MM), связанная с расщепляемой группой (CM) присоединена к антигенсвязывающему домену IgG и маскирует его. В некоторых вариантах осуществления маскирующая группа (MM), связанная с расщепляемой группой (CM), присоединена к антигенсвязывающему домену по меньшей мере одного scFv и маскирует его. В некоторых вариантах осуществления маскирующая группа (MM), связанная с расщепляемой группой (CM), присоединена к антигенсвязывающему домену IgG и маскирует его, и маскирующая группа (MM), связанная с расщепляемой группой (CM), присоединена к антигенсвязывающему домену по меньшей мере одного scFv и маскирует его.

Это описание относится к примерам структур мультиспецифического активируемого антитела, которые включают в себя, но без ограничения, следующие: (VL-CL)₂: (VH-CH1-CH2-CH3-L4-VH*-L3-VL*-L2-CM-L1-MM)₂; (VL-CL)₂: (VH-CH1-CH2-CH3-L4-VL*-L3-VH*-L2-CM-L1-MM)₂; (MM-L1-CM-L2-VL-CL)₂: (VH-CH1-CH2-CH3-L4-VH*-L3-VL*)₂; (MM-L1-CM-L2-VL-CL)₂: (VH-CH1-CH2-CH3-L4-VL*-L3-VH*)₂; (VL-CL)₂: (MM-L1-CM-L2-VL*-L3-VH*-L4-VH-CH1-CH2-CH3)₂; (VL-CL)₂: (MM-L1-CM-L2-VH*-L3-VL*-L4-VH-CH1-CH2-CH3)₂; (MM-L1-CM-L2-VL-CL)₂: (VL*-L3-VH*-L4-VH-CH1-CH2-CH3)₂; (MM-L1-CM-L2-VL-CL)₂: (VH*-L3-VL*-L4-VH-CH1-CH2-CH3)₂; (VL-CL-L4-VH*-L3-VL*-L2-CM-L1-MM)₂: (VH-CH1-CH2-CH3)₂; (MM-L1-CM-L2-VL*-L3-VH*-L4-VL-CL)₂: (VH-CH1-CH2-CH3)₂; (MM-L1-CM-L2-VH*-L3-VL*-L4-VL-CL)₂: (VH-CH1-CH2-CH3)₂; (VL-CL-L4-VH*-L3-VL*-L2-CM-L1-MM)₂: (VH-CH1-CH2-CH3)₂; (MM-L1-CM-L2-VL*-L3-VH*-L4-VL-CL)₂: (VH-CH1-CH2-CH3)₂; (VL-CL-L4-VH*-L3-VL*-L2-CM-L1-MM)₂: (MM-L1-CM-L2-VH*-L3-VL*-L4-VH-CH1-CH2-CH3)₂; (VL-CL-L4-VH*-L3-VL*-L2-CM-L1-MM)₂: (MM-L1-CM-L2-VH*-L3-VL*-L4-VH-CH1-CH2-CH3)₂; (VL-CL-L4-VH*-L3-VL*)₂: (MM-L1-CM-L2-VL*-L3-VH*-L4-VH-CH1-CH2-CH3)₂; (VL-CL-L4-VH*-L3-VL*)₂: (MM-L1-CM-L2-VH*-L3-VL*-L4-VH-CH1-CH2-CH3)₂; (VL-CL-L4-VL*-L3-VH*)₂: (MM-L1-CM-L2-VL*-L3-VH*-L4-VH-CH1-CH2-CH3)₂; (VL-CL-L4-VL*-L3-VH*)₂: (MM-L1-CM-L2-VH*-L3-VL*-L4-VH-CH1-CH2-CH3)₂; (VL-CL-L4-VH*-L3-VL*-L2-CM-L1-MM)₂: (VL*-L3-VH*-L4-VH-CH1-CH2-CH3)₂; (VL-CL-L4-VH*-L3-VL*-L2-CM-L1-MM)₂: (VH*-L3-VL*-L4-VH-CH1-CH2-CH3)₂; (VL-CL-L4-VL*-L3-VH*-L2-CM-L1-MM)₂: (VL*-L3-VH*-L4-VH-CH1-CH2-CH3)₂; или (VL-CL-L4-VL*-L3-VH*-L2-CM-L1-MM)₂: (VH*-L3-VL*-L4-VH-CH1-CH2-CH3)₂, где VL и VH представляют собой переменные домены легкой и тяжелой цепи для первой специфичности, содержащиеся в IgG; VL* и VH* представляют собой переменные домены второй специфичности, содержащиеся в scFv; L1 представляет собой линкерный пептид, соединяющий маскирующую группу (MM) и расщепляемую группу (CM); L2 представляет собой линкерный пептид, соединяющий расщепляемую группу (CM) и антитело; L3 представляет собой линкерный пептид, соединяющий переменные домены scFv; L4 представляет собой линкерный пептид, соединяющий антитело первой специфичности с антителом второй специфичности; CL представляет собой константный домен легкой цепи; и CH1, CH2, CH3 представляют собой константные домены тяжелой цепи. Первая и вторая специфичности могут быть нацелены на любой антиген или эпигот.

В некоторых вариантах осуществления привлекающего Т-клетки мультиспецифического активируемого антитела, один антиген представляет собой CD71, и другой антиген как правило, представляет собой стимулирующий (также обозначаемый в настоящем документе как активирующий) или ингибирующий рецептор, присутствующий на поверхности Т-клетки, клетки естественного киллера (NK), миелоидной мононуклеарной клетки, макрофага и/или другой иммуноэффекторной клетки, такой как, но без ограничения, B7-H4, BTLA, CD3, CD4, CD8, CD16a, CD25, CD27, CD28, CD32, CD56, CD137 (также обозначаемый как TNFRSF9), CTLA-4, GITR, HVEM, ICOS, LAG3, NKG2D, OX40, PD-1, TIGIT, TIM3 или VISTA. Домен антитела, придающий специфичность к поверхностному антигену Т-клетки, можно также заменить на лиганд или домен лиганда, связывающие Т-клеточный рецептор, рецептор клетки NK, рецептор макрофага и/или рецептор другой иммуноэффекторной клетки.

В некоторых вариантах осуществления нацеливающее антитело представляет собой антитело против CD71, описанное в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления нацеливающее антитело может находиться в форме активируемого антитела. В некоторых вариантах осуществления scFv (несколько scFv) могут находиться в форме про-scFv (См., например, WO 2009/025846, WO 2010/081173).

В некоторых вариантах осуществления scFv является специфическим для связывания CD3ε, и содержит антитело или его фрагмент или происходит из антитела или его фрагмента, связывающих CD3ε, например, CH2527, FN18, H2C, OKT3, 2C11, UCHT1, или V9. В некоторых вариантах осуществления scFv является специфическим для связывания CTLA-4 (также обозначаемого в настоящем документе как CTLA и CTLA4).

В некоторых вариантах осуществления, scFv против CTLA-4 содержит аминокислотную последовательность:

```
GGGSGGGSGSGGGSGGGSGGGGEIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAW
YQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQYQYSSPLTFG
GGTKVEIKRSGGSTITSYNVYYTKLSSSGTQVQLVQTGGGWQPGRSLRLSCAASGSTFFSYAMSW-
VRQAPGKGLEWVSAISGGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCATNSLYW-
YFDLWGRGTLTVSSAS (SEQ ID NO: 643)
```

В некоторых вариантах осуществления scFv против CTLA-4 содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичную аминокислотной последовательности из SEQ ID NO: 643.

В некоторых вариантах осуществления scFv против CD3s содержит аминокислотную последовательность:

GGGSGGGSGSGGGSGGGSGGGQVQLQQSGAELARPGASVKMSCKASGYTFTRYTMHW
 VKQRPGQGLEWIGYINPSRGYTNYNQKFKDKATLTTDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARYY
 DDHYCLDYWGQGTTLTVSSGGGGSGGGGSGGGGSIQVLTQSPAIMASPGKEKVTMTCSASSSVS
 YMNWYQQKSGTSPKRWIYDTSKLAGSVPANFRGSGSGTYSYSLTISGMEAEDAATYYCQQWSSNP
 FTFGSGTKLEINR (SEQ ID NO: 644)

В некоторых вариантах осуществления scFv против CD3s содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичную аминокислотной последовательности из SEQ ID NO: 644.

В некоторых вариантах осуществления, scFv является специфическим для связывания одной или нескольких Т-клеток, одной или нескольких клеток NK и/или одного или нескольких макрофагов. В некоторых вариантах осуществления scFv является специфическим для связывания мишени, выбранной из группы, состоящей из B7-H4, BTLA, CD3, CD4, CD8, CD16a, CD25, CD27, CD28, CD32, CD56, CD137, CTLA-4, GITR, HVEM, ICOS, LAG3, NKG2D, OX40, PD-1, TIGIT, TIM3 или VISTA.

В некоторых вариантах осуществления мультиспецифическое активируемое антитело содержит также средство, конъюгированное с АВ. В некоторых вариантах осуществления средство представляет собой лекарственное средство. В некоторых вариантах осуществления средство представляет собой антинеопластическое средство. В некоторых вариантах осуществления средство представляет собой токсин или его фрагмент. В некоторых вариантах осуществления средство является конъюгированным с мультиспецифическим активируемым антителом посредством линкера. В некоторых вариантах осуществления средство является конъюгированным с АВ посредством расщепляемого линкера. В некоторых вариантах осуществления линкер представляет собой нерасщепляемый линкер. В некоторых вариантах осуществления средство представляет собой ингибитор микротрубочек. В некоторых вариантах осуществления средство представляет собой повреждающее нуклеиновую кислоту средство, такое как алкилирующее ДНК средство или интеркалирующее в ДНК средство, или другое повреждающее ДНК средство. В некоторых вариантах осуществления линкер представляет собой расщепляемый линкер. В некоторых вариантах осуществления средство представляет собой средство, выбранное из группы, перечисленной в табл. 5. В некоторых вариантах осуществления средство представляет собой доластатин. В некоторых вариантах осуществления средство представляет собой ауристин или его производное. В некоторых вариантах осуществления средство представляет собой ауристин Е или его производное. В некоторых вариантах осуществления средство представляет собой монометилауристин Е (ММАЕ). В некоторых вариантах осуществления средство представляет собой монометилауристин D (ММАД). В некоторых вариантах осуществления средство представляет собой майтанзиноид или производное майтанзиноида. В некоторых вариантах осуществления средство представляет собой DM1 или DM4. В некоторых вариантах осуществления средство представляет собой дуокармицин или его производное. В некоторых вариантах осуществления средство представляет собой калихеамицин или его производное. В некоторых вариантах осуществления средство представляет собой пиролобензодиазепин. В некоторых вариантах осуществления средство представляет собой димер пиролобензодиазепина.

В некоторых вариантах осуществления мультиспецифическое активируемое антитело содержит также поддающуюся детекции группу. В некоторых вариантах осуществления поддающаяся детекции группа представляет собой диагностическое средство.

В некоторых вариантах осуществления мультиспецифическое активируемое антитело естественным образом содержит одну или несколько дисульфидных связей. В некоторых вариантах осуществления мультиспецифическое активируемое антитело можно конструировать для включения одной или нескольких дисульфидных связей.

Описание относится также к выделенной молекуле нуклеиновой кислоты, кодирующей мультиспецифическое активируемое антитело, описанное в настоящем документе, так же как векторы, содержащие эти выделенные последовательности нуклеиновой кислоты. Описание относится к способам получения мультиспецифического активируемого антитела посредством культивирования клетки в условиях, обеспечивающих экспрессию активируемого антитела, где клетка содержит такую молекулу нуклеиновой кислоты. В некоторых вариантах осуществления клетка содержит такой вектор.

Описание относится также к способу изготовления мультиспецифических активируемых антител по этому описанию посредством (а) культивирования клетки, содержащей конструкцию нуклеиновой кислоты, кодирующую мультиспецифическое активируемое антитело в условиях, обеспечивающих экспрессию мультиспецифического активируемого антитела, и (b) выделения мультиспецифического активируемого антитела. Пригодные АВ, ММ, и/или СМ включают в себя любую из АВ, ММ и/или СМ, описанных в настоящем документе.

Описание относится также к мультиспецифическим активируемым антителам и/или к композициям мультиспецифического активируемого антитела, содержащим по меньшей мере первое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент (АВ1), специфически связывающие первую мишень или первый эпитоп, и второе антитело или его антигенсвязывающий фрагмент (АВ2), связывающие вторую мишень или второй эпитоп, где по меньшей мере АВ1 связано или иным образом соединено с маскирующей группой (ММ1), таким образом, что присоединение ММ1 уменьшает способность АВ1 связывать его мишень. В

некоторых вариантах осуществления ММ1 присоединена к АВ1 через последовательность расщепляемой группы (СМ1), содержащую субстрат для протеазы, например, протеазы, локализованной совместно с мишенью АВ1 в участке лечения или участке диагностики у субъекта. Мультиспецифические активируемые антитела, представленные в настоящем документе, являются стабильными в кровотоке, активируемыми в намеченных для терапии и/или диагностики участках, но не в нормальной, т.е., здоровой ткани, и при активации обладают связыванием с мишенью АВ1, по меньшей мере, сравнимым с соответствующим, немодифицированным мультиспецифическим антителом. Пригодные АВ, ММ и/или СМ включают в себя любые из АВ, ММ и/или СМ, описанных в настоящем документе.

Описание относится также к композициям и способам, включающим в себя мультиспецифическое активируемое антитело, содержащее, по меньшей мере, первое антитело или фрагмент антитела (АВ1), специфически связывающее мишень, и второе антитело или фрагмент антитела (АВ2), где, по меньшей мере, первый АВ в мультиспецифическом активируемом антителе присоединен к маскирующей группе (ММ1), уменьшающей способность АВ1 связывать его мишень. В некоторых вариантах осуществления каждый АВ присоединен к ММ, уменьшающей способность соответствующего ей АВ связывать каждую мишень. Например, в вариантах осуществления биспецифического активируемого антитела АВ1 присоединен к первой маскирующей группе (ММ1), уменьшающей способность АВ1 связывать его мишень, и АВ2 присоединен к второй маскирующей группе (ММ2), уменьшающей способность АВ2 связывать его мишень. В некоторых вариантах осуществления мультиспецифическое активируемое антитело содержит более двух областей АВ; в таких вариантах осуществления АВ1 присоединен к первой маскирующей группе (ММ1), уменьшающей способность АВ1 связывать его мишень, АВ2 присоединен к второй маскирующей группе (ММ2), уменьшающей способность АВ2 связывать его мишень, АВ3 присоединен к третьей маскирующей группе (ММ3), уменьшающей способность АВ3 связывать его мишень, и так далее для каждого АВ в мультиспецифическом активируемом антителе. Пригодные АВ, ММ и/или СМ включают в себя любую из АВ, ММ, и/или СМ, описанных в настоящем документе.

В некоторых вариантах осуществления мультиспецифическое активируемое антитело дополнительно содержит по меньшей мере одну расщепляемую группу (СМ), являющуюся субстратом для протеазы, где СМ связывает ММ с АВ. Например, в некоторых вариантах осуществления мультиспецифическое активируемое антитело содержит, по меньшей мере, первое антитело или фрагмент антитела (АВ1), специфически связывающее мишень, и второе антитело или фрагмент антитела (АВ2), где, по меньшей мере, первый АВ в мультиспецифическом активируемом антителе присоединен посредством первой расщепляемой группы (СМ1) к маскирующей группе (ММ1), уменьшающей способность АВ1 связывать его мишень. В некоторых вариантах осуществления биспецифического активируемого антитела, АВ1 присоединен посредством СМ1 к ММ1, и АВ2 присоединен посредством второй расщепляемой группы (СМ2) к второй маскирующей группе (ММ2), уменьшающей способность АВ2 связывать его мишень. В некоторых вариантах осуществления мультиспецифическое активируемое антитело содержит более двух областей АВ; в некоторых из этих вариантов осуществления, АВ1 присоединен посредством СМ1 к ММ1, АВ2 присоединен посредством СМ2 к ММ2, и АВ3 присоединен посредством третьей расщепляемой группы (СМ3) к третьей маскирующей группе (ММ3), уменьшающей способность АВ3 связывать его мишень, и так далее для каждого АВ в мультиспецифическом активируемом антителе. Пригодные АВ, ММ, и/или СМ включают в себя любую из АВ, ММ и/или СМ, описанных в настоящем документе.

Активируемые антитела, обладающие не связывающими стерическими группами, или партнеры по связыванию для несвязывающих стерических групп

Описание относится также к активируемым антителам, содержащим несвязывающие стерические группы (NB) или партнеров по связыванию (BP) для несвязывающих стерических групп, где BP рекрутирует или иным образом привлекает NB к активируемому антителу. Активируемые антитела, представленные в настоящем документе, включают в себя, например, активируемое антитело, содержащее несвязывающую стерическую группу (NB), расщепляемый линкер (CL) и антитело или фрагмент антитела (AB), связывающие мишень; активируемое антитело, содержащее партнера по связыванию для несвязывающей стерической группы (BP), CL и AB; и активируемое антитело, содержащее BP, к которому рекрутируется NB, CL и AB, связывающие мишень. Активируемые антитела, в которых NB ковалентно присоединена к CL и AB активируемого антитела или ассоциирована посредством взаимодействия с BP, ковалентно присоединенному к CL и AB активируемого антитела, представляют собой, как упомянуто в настоящем документе, "содержащие NB активируемые антитела". Под активируемым или переключаемым понимают, что активируемое антитело обладает первым уровнем связывания с мишенью, когда активируемое антитело находится в ингибированном, маскированном или нерасщепленном состоянии (т.е., первой конформации), и вторым уровнем связывания с мишенью, когда активируемое антитело находится в неингибированном, немаскированном и/или расщепленном состоянии (т.е., второй конформации, т.е., активированное антитело), где второй уровень связывания мишени превышает первый уровень связывания мишени. Композиции активируемого антитела могут обладать увеличенной биодоступностью и более благоприятным биораспределением по сравнению с общепринятыми лекарственными средствами на основе антитела.

В некоторых вариантах осуществления активируемые антитела обеспечивают уменьшенные ток-

сичность и/или неблагоприятные побочные эффекты, которые в ином случае могут возникнуть в результате связывания в участках, не подлежащих лечению и/или не подлежащих диагностике, если АВ не является замаскированным или его связывание с таким участком иным образом не ингибировано.

Активируемые антитела против CD71, содержащие несвязывающую стерическую группу (NB), можно получать с использованием способов, указанных в Публикации РСТ № WO 2013/192546, полное содержание которой приведено в настоящем документе в качестве ссылки.

Применение антител, конъюгированных, активируемых антител, и конъюгированных активируемых антител. Понятно, что при введении терапевтических молекул в соответствии с описанием, их вводят с пригодными носителями, наполнителями и другими средствами, которые включают в составы для обеспечения улучшенного переноса, доставки, переносимости и т.п. Множество пригодных составов можно обнаружить в справочнике, известном всем специалистам в области фармацевтической химии: Remington's Pharmaceutical Sciences (15th ed, Mack Publishing Company, Easton, PA (1975)), в частности, раздел 87 от Blaug, Seymour, в этом документе. Эти составы включают в себя, например, порошки, пасты, мази, желе, воски, масла, липиды, содержащие липид (катионный или анионный) везикулы (такие как Липофектин™), конъюгаты ДНК, безводные абсорбирующие пасты, эмульсии масло-в-воде и вода-в-масле эмульсии, эмульсионный карбовакс (полиэтиленгликоли с различными молекулярными массами), полутвердые гели и полутвердые смеси, содержащие карбовакс. Любые из вышеупомянутых смесей могут являться пригодными для обработки и терапии в соответствии с настоящим описанием, при условии, что активный ингредиент в составе не инактивируется при получении состава и состав является физиологически совместимым и переносимым при этом способе введения. См. также Baldrick P. "Pharmaceutical excipient development: the need for preclinical guidance". Regul. Toxicol Pharmacol. 32(2):210-8 (2000), Wang W. "Lyophilization and development of solid protein Pharmaceuticals". Int. J. Pharm. 203 (1-2):1-60 (2000), Charman WN "Lipids, lipophilic drugs, and oral drug delivery-some emerging concepts". J Pharm Sci. 89(8):967-78 (2000), Powell et al. "Compendium of excipients for parenteral formulations" PDA J Pharm Sci Technol. 52:238-311 (1998) и процитированные в них ссылки для дополнительной информации относительно составов, наполнителей и носителей, хорошо известных специалистам в области фармацевтической химии.

Терапевтические составы по этому описанию, содержащие антитело против CD71 и/или активируемое антитело против CD71, такие как, в качестве неограничивающего примера, антитело, конъюгированное антитело, активируемое антитело и/или конъюгированное активируемое антитело, используют для предотвращения, лечения или облегчения иным образом заболевания или нарушения, ассоциированного с измененной экспрессией и/или активностью мишени. Например, терапевтические составы по этому описанию, содержащие антитело, конъюгированное антитело, активируемое антитело и/или конъюгированное активируемое антитело, используют для лечения или облегчения иным образом злокачественной опухоли или другого неопластического состояния, воспаления, воспалительного нарушения и/или аутоиммунного заболевания. В некоторых вариантах осуществления злокачественная опухоль представляет собой солидную опухоль или гематологическое злокачественное новообразование, где экспрессируется мишень. В некоторых вариантах осуществления злокачественная опухоль представляет собой солидную опухоль, где экспрессируется мишень. В некоторых вариантах осуществления злокачественная опухоль представляет собой гематологическое злокачественное новообразование, где экспрессируется мишень. В некоторых вариантах осуществления мишень экспрессирована на паренхиме (например, в злокачественной опухоли, в части органа или ткани, которая часто выполняет функцию(функции) органа или ткани). В некоторых вариантах осуществления мишень экспрессирована на клетке, ткани или органе. В некоторых вариантах осуществления мишень экспрессирована на строме (т.е., соединительного поддерживающего каркаса клетки, ткани или органа). В некоторых вариантах осуществления мишень экспрессирована на остеобласте. В некоторых вариантах осуществления мишень экспрессирована на эндотелии (в сосудистой сети). В некоторых вариантах осуществления мишень экспрессирована на стволовой клетки злокачественной опухоли. В некоторых вариантах осуществления средство с которым конъюгировано антитело и/или активируемое антитело, представляет собой ингибитор микротрубочек. В некоторых вариантах осуществления средство с которым конъюгировано антитело и/или активируемое антитело, представляет собой повреждающее нуклеиновую кислоту средство.

Эффективность предотвращения, облегчения или лечения определяют в соответствии с любым известным способом диагностики или лечения заболевания или нарушения, ассоциированного с экспрессией и/или активностью мишени, например, такой как, измененная экспрессия и/или активность мишени. Продление выживаемости субъекта или задержка иным образом прогрессирования заболевания или нарушения, ассоциированного с экспрессией и/или активностью мишени, например, измененной экспрессией и/или активностью мишени, у субъекта указывает на то, что антитело, конъюгированное антитело, активируемое антитело и/или конъюгированное активируемое антитело обеспечивает клиническое преимущество.

Антитело, конъюгированное антитело, активируемое антитело и/или конъюгированное активируемое антитело можно вводить в форме фармацевтических композиций. Принципы и соображения, вовлеченные в получение таких композиций, так же как руководство по выбору компонентов, представлены,

например, в Remington: The Science And Practice Of Pharmacy 19th ed. (Alfonso R. Gennaro, et al., editors) Mack Pub. Co., Easton, Pa.: 1995; Drug Absorption Enhancement: Concepts, Possibilities, Limitations, And Trends, Harwood Academic Publishers, Langhorne, Pa., 1994; и Peptide And Protein Drug Delivery (Advances In Parenteral Sciences, Vol. 4), 1991, M. Dekker, New York.

В некоторых вариантах осуществления, где используют фрагменты антител, выбирают наименьший фрагмент, специфически связывающийся со связывающим доменом белка-мишени. Например, на основании последовательностей варибельной области антитела, можно разрабатывать пептидные молекулы, сохраняющие способность связывать белковую последовательность-мишень. Такие пептиды можно синтезировать химически и/или получать посредством технологии рекомбинантной ДНК. (См., например, Marasco et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 7889-7893 (1993)). Состав может также содержать более одного активного соединения, как необходимо для конкретного показания, подвергаемого лечению, например, в некоторых вариантах осуществления, соединения с взаимодополняющей активностью, не оказывающие неблагоприятного воздействия друг на друга. В некоторых вариантах осуществления, или дополнительно, композиция может содержать средство, улучшающее ее функцию, например, такое как цитотоксическое средство, цитокин, химиотерапевтическое средство, или ингибирующее рост средство. Такие молекулы подходящим образом присутствуют в комбинации в количествах, которые являются эффективными для намеченной цели.

Активные ингредиенты можно также заключать в микрокапсулы, полученные, например, посредством способов коацервации или посредством межповерхностной полимеризации, например, микрокапсулы из гидроксиметилцеллюлозы или желатина и поли-(метилметакрилатные) микрокапсулы, соответственно, в коллоидных системах доставки лекарственных средств (например, липосомах, альбуминовых микросферах, микроэмульсиях, наночастицах и микрокапсулах) или в макроэмульсиях.

Составы для применения для введения *in vivo*, введение должны являться стерильными. Этого легко достигают фильтрацией через стерильные мембраны для фильтрации.

Можно получать препараты с замедленным высвобождением. Подходящие примеры препаратов с замедленным высвобождением включают в себя полупроницаемые матрицы твердых гидрофобных полимеров, содержащих антитело, где матрицы находятся в форме сформованных изделий, например пленок или микрокапсул. Примеры матриц для замедленного высвобождения включают в себя полиэфир, гидрогели (например, поли(2-гидроксиэтилметакрилат), или поли(виниловый спирт)), полилактиды (Патент США No. 3773919), сополимеры L-глутаминовой кислоты и γ -этил-L-глутамата, недеградируемый этиленвинилацетат, деградируемые сополимеры молочной кислоты - гликолевой кислоты, такие как LU-PRON DEPOT™ (пригодные для инъекции микросферы, состоящие из сополимера молочной кислоты - гликолевой кислоты и ацетата леупролида), и поли-D-(-)-3- гидроксимасляную кислоту. В то время как полимеры, такие как этиленвинилацетат и молочная кислота-гликолевая кислота, позволяют высвобождение молекул в течение более 100 суток, конкретные гидрогели высвобождают белки в течение более коротких периодов времени.

В некоторых вариантах осуществления антитело, конъюгированное антитело, активируемое антитело и/или конъюгированное активируемое антитело содержит поддающуюся детекции метку. Используют интактное антитело или его фрагмент (например, Fab, scFv, или F(ab)₂). Термин "меченый", по отношению к зонду или антителу, предназначен для включения прямого мечения зонда или антитела посредством присоединения (т.е., физического связывания) поддающегося детекции вещества к зонду или антителу, так же как непрямого мечения зонда или антитела посредством реакционной способности по отношению к другому реагенту, который является меченым напрямую. Примеры непрямого мечения включают в себя детекцию первичного антитела с использованием флуоресцентно меченного вторичного антитела и концевое мечение ДНК-зонда с использованием биотина, так что его можно детектировать с использованием флуоресцентно меченного стрептавидина. Термин "биологический образец" предназначен для включения тканей, клеток и биологических жидкостей, выделенных из субъекта, так же как тканей, клеток и жидкостей, присутствующих внутри субъекта. Таким образом, в применение термина "биологический образец" включены кровь и фракция или компонент крови, включая сыворотку крови, плазму крови или лимфу. То есть, способ детекции по этому описанию можно использовать для детекции анализита мРНК, белка или геномной ДНК в биологическом образце *in vitro*, так же как *in vivo*. Например, способы *in vitro* для детекции анализита мРНК включают в себя способы Нозерн-гибридизации и гибридизации *in situ*. Способы *in vitro* для детекции белкового анализита включает в себя твердофазные иммуноферментные анализы (ELISA), Вестерн-блоттинг, иммунопреципитации, иммунохимическое окрашивание и иммунофлуоресценцию. Способы *in vitro* для детекции анализита геномной ДНК включают в себя способы Саузерн-гибридизации. Способы проведения иммуноанализов описаны, например, в "ELISA: Theory and Practice: Methods in Molecular Biology", Vol. 42, J. R. Crowther (Ed.) Human Press, Totowa, NJ, 1995; "Immunoassay", E. Diamandis and T. Christopoulos, Academic Press, Inc., San Diego, CA, 1996; и "Practice and Theory of Enzyme Immunoassays", P. Tijssen, Elsevier Science Publishers, Amsterdam, 1985. Более того, способы *in vivo* для детекции белкового анализита включают в себя введение субъекту меченного антитела против белкового анализита. Например, антитело можно метить с использованием ра-

диоактивного маркера, присутствие и локализацию которого можно детектировать стандартными способами визуализации.

Антитела, конъюгированные антитела, активируемые антитела и/или конъюгированные активируемые антитела по этому описанию можно также использовать во множестве диагностических и профилактических составов. В одном варианте осуществления антитело, конъюгированное антитело, активируемое антитело и/или конъюгированное активируемое антитело вводят пациентам, подверженным риску развития одного или нескольких вышеупомянутых нарушений. Предрасположенность пациента или органа к одному или нескольким из вышеупомянутых нарушений можно определять с использованием генотипических, серологических или биохимических маркеров.

В некоторых вариантах осуществления по этому описанию антитело, конъюгированное антитело, активируемое антитело и/или конъюгированное активируемое антитело вводят индивидуумам-людям с диагностированным клиническим показателем, ассоциированным с одним или несколькими из вышеупомянутых нарушений. После диагностики, антитело, конъюгированное антитело, активируемое антитело и/или конъюгированное активируемое антитело вводят для смягчения или обращения эффектов клинического показателя.

Антитело, конъюгированное антитело, активируемое антитело и/или конъюгированное активируемое антитело по этому описанию можно также использовать для детекции мишени в образцах от пациентов и, соответственно, можно использовать в качестве диагностических средств. Например, антитела и/или активируемые антитела, и их конъюгированные варианты по этому описанию используют в анализах *in vitro*, например, ELISA, для детекции уровней мишени в образце от пациента.

В одном варианте осуществления антитело, конъюгированное антитело, активируемое антитело и/или конъюгированное активируемое антитело по этому описанию иммобилизуют на твердой подложке (например, в лунке(лунках) микропланшета для титрования). Иммобилизованное антитело, конъюгированное антитело, активируемое антитело и/или конъюгированное активируемое антитело служит в качестве связывающего антитела для любой мишени, которая может присутствовать в тестируемом образце. Перед приведением иммобилизованного антитела и/или активируемого антитела и/или их конъюгированных вариантов, в контакт с образцом от пациента, твердую подложку промывают и обрабатывают с использованием блокирующего средства, такого как молочный белок или альбумин, для предотвращения неспецифической адсорбции аналита.

Затем лунки обрабатывают тестируемым образцом, как подозревают, содержащим антиген, или раствором, содержащим стандартное количество антигена. Такой образец представляет собой, например, образец сыворотки от субъекта, как подозревают, обладающего уровнями циркулирующего антигена, рассматриваемыми как диагностические для патологии. После отмывки тестируемого образца или стандарта, твердую подложку обрабатывают вторичным антителом, меченным поддающейся детекции меткой. Меченное вторичное антитело служит в качестве детектирующего антитела. Измеряют уровень поддающейся детекции метки и концентрацию антигена-мишени в тестируемом образце определяют по стандартной кривой, полученной для стандартных образцов.

Следует понимать, что на основании результатов, полученных с использованием антител и активируемых антител по этому описанию, и их конъюгированных вариантов, в диагностическом анализе *in vitro*, можно определять стадию заболевания у субъекта на основании уровней экспрессии антигена-мишени. Для данного заболевания образцы крови отбирают у субъектов, диагностированных как находящихся на различных стадиях прогрессирования заболевания, и/или в различных точках терапевтического лечения заболевания. С использованием популяции образцов, обеспечивающей статистически значимые результаты для каждой стадии прогрессирования или терапии, разрабатывают диапазон концентраций антигена, который можно считать характерным для каждой стадии.

Антитело, конъюгированное антитело, активируемое антитело и/или конъюгированное активируемое антитело можно также использовать в способах диагностики и/или визуализации. В некоторых вариантах осуществления такие способы представляют собой способы *in vitro*. В некоторых вариантах осуществления такие способы представляют собой способы *in vivo*. В некоторых вариантах осуществления такие способы представляют собой способы *in situ*. В некоторых вариантах осуществления такие способы представляют собой способы *ex vivo*. Например, активируемые антитела, обладающие ферментативно расщепляемыми СМ, можно использовать для детекции присутствия или отсутствия фермента, способного расщеплять СМ. Такие активируемые антитела можно использовать в диагностике, которая может включать в себя детекцию *in vivo* (например, качественную или количественную) активности фермента (или, в некоторых вариантах осуществления, окружающей среды с увеличенным восстановительным потенциалом, такого как тот, что может обеспечивать восстановление дисульфидной связи) посредством измерения накопления активированных антител (т.е., антител, возникающих в результате расщепления активируемого антитела) в данной клетке или ткани данного организма-хозяина. Такое накопление активированных антител указывает не только на то, что ткань обладает ферментативной активностью (или увеличенным восстановительным потенциалом, в зависимости от природы СМ), но также на то, что ткань экспрессирует мишень, с которой связывается активированное антитело.

Например, можно выбрать СМ, чтобы она являлась субстратом для по меньшей мере одной про-

теазы, обнаруженной в участке опухоли, в участке вирусной или бактериальной инфекции в биологически ограниченном участке (например, при абсцессе, в органе и т.п.) и т.п. АВ может представлять собой АВ, связывающую антиген-мишень. С использованием способов, описанных в настоящем документе, или когда это целесообразно, способов, известных специалисту в данной области, поддающуюся детекции метку (например, флуоресцентную метку или радиоактивную метку или радиоактивный индикатор) можно конъюгировать с АВ или другой областью антитела и/или активируемого антитела. Пригодные поддающиеся детекции метки обсуждают в контексте вышеуказанных способов скрининга, и дополнительные конкретные примеры представлены ниже. С использованием АВ, специфического для белка или пептида в состоянии заболевания, вместе с по меньшей мере одной протеазой, активность которой повышена в пораженной заболеванием представляющей интерес ткани, активируемые антитела обладают увеличенной скоростью связывания с пораженной заболеванием тканью по сравнению с тканями, где специфический для СМ фермент не присутствует на поддающемся детекции уровне или присутствует на более низком уровне, чем в пораженной заболеванием ткани, или является неактивным (например, в форме зимогена или в комплексе с ингибитором). Поскольку небольшие белки и пептиды быстро выводятся из крови посредством системы фильтрации почек, и поскольку фермент, специфический для СМ, не присутствует на поддающемся детекции уровне (или присутствует на более низких уровнях в не пораженных заболеванием тканях, или присутствует в неактивной конформации), накопление активированных антител в пораженной заболеванием ткани увеличено по сравнению с не пораженными заболеванием тканями.

В другом примере активируемые антитела можно использовать для детекции присутствия или отсутствия расщепляющего средства в образце. Например, где активируемые антитела содержат СМ, чувствительную к расщеплению ферментом, активируемые антитела можно использовать для детекции (либо качественно, либо количественно) присутствия фермента в образце. В другом примере, где активируемые антитела содержат СМ, чувствительную к расщеплению восстанавливающим средством, активируемые антитела можно использовать для детекции (либо качественно, либо количественно) присутствия восстанавливающих условий в образце. Для облегчения анализа в этих способах активируемые антитела можно метить поддающейся детекции меткой, и можно связывать с подложкой (например, твердой подложкой, такой как стекло или бусина). Поддающуюся детекции метку можно располагать на части активируемого антитела, которая не высвобождается после расщепления, например, поддающаяся детекции метка может представлять собой погашенную флуоресцентную метку или другую метку, которая не поддается детекции, пока не произойдет расщепление. Анализ можно проводить, например, посредством приведения иммобилизованных, меченных поддающейся детекции меткой активируемых антител в контакт с образцом, как подозревают, содержащим фермент и/или восстанавливающее средство, в течение времени, достаточного, чтобы произошло расщепление, затем промывки для удаления избытка образца и загрязняющих примесей. Присутствие или отсутствие расщепляющего средства (например, фермента или восстанавливающего средства) в образце затем оценивают посредством изменения поддающегося детекции сигнала активируемых антител до контакта с образцом, например, присутствия и/или увеличения поддающегося детекции сигнала из-за расщепления активируемого антитела посредством расщепляющего средства в образце.

Такие способы детекции можно адаптировать, чтобы обеспечивать также детекцию присутствия или отсутствия мишени, способной связывать АВ активируемых антител при расщеплении. Таким образом, анализы можно адаптировать для оценки присутствия или отсутствия расщепляющего средства и присутствия или отсутствия представляющей интерес мишени. Присутствие или отсутствие расщепляющего средства можно детектировать по присутствию и/или увеличению количества поддающейся детекции метки из активируемых антител, как описано выше, и присутствие или отсутствие мишени можно детектировать посредством детекции комплекса мишень-АВ, например, посредством использования меченного поддающейся детекции меткой антитела против мишени.

Активируемые антитела также можно использовать для визуализации *in situ* для подтверждения активации активируемого антитела, например, посредством расщепления протеазой, и связывания с конкретной мишенью. Визуализация *in situ* представляет собой способ, позволяющий локализацию протеолитической активности и мишени биологических образцах, таких как культуры клеток или срезы тканей. С использованием этого способа, можно подтверждать как связывание с данной мишенью, так и протеолитическую активность, на основании присутствия поддающейся детекции метки (например, флуоресцентной метки).

Эти способы можно использовать для любых замороженных клеток или ткани, полученных из участка заболевания (например, ткани опухоли), или здоровых тканей. Эти способы можно также использовать для свежих образцов клеток или ткани.

В этих способах активируемое антитело метят поддающейся детекции меткой. Поддающаяся детекции метка может представлять собой флуоресцентный краситель, (например, флуорофор, изотиоцианат флуоресцеина (FITC), изотиоцианат родамина (TRITC), метку Alexa Fluor®), краситель в ближней инфракрасной (NIR) области спектра (например, нанокристаллы Qdot®), коллоидный металл, гаптен,

ванию АВ с мишенью, и в расщепленном, активированном состоянии, ММ не создает помехи или конкуренцию специфическому связыванию АВ с мишенью; и (ii) измерения уровня активированного активируемого антитела у субъекта или в образце, где поддающийся детекции уровень активированного активируемого антитела у субъекта или в образце показывает, что расщепляющее средство присутствует у субъекта или в образце, и где не поддающийся детекции уровень активированного активируемого антитела у субъекта или в образце показывает, что расщепляющее средство отсутствует и/или не присутствует в достаточном количестве у субъекта или в образце. В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело представляет собой активируемое антитело, конъюгированное с лекарственным средством. В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело не является конъюгированным со средством. В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело содержит поддающуюся детекции метку. В некоторых вариантах осуществления поддающаяся детекции метка расположена на АВ. В некоторых вариантах осуществления измерение уровня активированного антитела у субъекта или в образце осуществляют с использованием вторичного реагента, специфически связывающего активированное антитело, где реагент содержит поддающуюся детекции метку. В некоторых вариантах осуществления вторичный реагент представляет собой антитело, содержащее поддающуюся детекции метку.

Описание относится также к наборам для применения в способах детекции присутствия или отсутствия расщепляющего средства и мишени у субъекта или в образце, где наборы содержат по меньшей мере одно активируемое антитело, содержащее маскирующую группу (ММ), расщепляемую группу (СМ), расщепляемую посредством расщепляющего средства, например, протеазы, и антигенсвязывающий домен или его фрагмент (АВ), специфически связывающий представляющую интерес мишень, где активируемое антитело в нерасщепленном, неактивированном состоянии обладает следующей структурной аранжировкой от N-конца к С-концу: ММ-СМ-АВ или АВ-СМ-ММ; (a) где ММ представляет собой пептид, ингибирующий связывание АВ с мишенью, и где ММ не обладает аминокислотной последовательностью природного партнера по связыванию АВ и не является модифицированной формой природного партнера по связыванию АВ; и (b) где в нерасщепленном, неактивированном состоянии ММ мешает специфическому связыванию АВ с мишенью, и в расщепленном, активированном состоянии, ММ не создает помехи или конкуренцию специфическому связыванию АВ с мишенью; и (ii) измерения уровня активированного активируемого антитела у субъекта или в образце, где поддающийся детекции уровень активированного активируемого антитела у субъекта или в образце показывает, что расщепляющее средство присутствует у субъекта или в образце и где не поддающийся детекции уровень активированного активируемого антитела у субъекта или в образце показывает, что расщепляющее средство отсутствует и/или не присутствует в достаточном количестве у субъекта или в образце. В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело представляет собой активируемое антитело, конъюгированное с лекарственным средством. В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело не является конъюгированным со средством. В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело содержит поддающуюся детекции метку. В некоторых вариантах осуществления поддающаяся детекции метка расположена на АВ. В некоторых вариантах осуществления измерение уровня активированного антитела у субъекта или в образце осуществляют с использованием вторичного реагента, специфически связывающего активированное антитело, где реагент содержит поддающуюся детекции метку. В некоторых вариантах осуществления вторичный реагент представляет собой антитело, содержащее поддающуюся детекции метку.

Описание относится также к способам детекции присутствия или отсутствия расщепляющего средства у субъекта или в образце посредством (i) приведения субъекта или образца в контакт с активируемым антителом, где активируемое антитело содержит маскирующую группу (ММ), расщепляемую группу (СМ), расщепляемую посредством расщепляющего средства, например протеазы, антигенсвязывающий домен (АВ), специфически связывающий мишень, и поддающуюся детекции метку, где активируемое антитело в нерасщепленном, неактивированном состоянии обладает следующей структурной аранжировкой от N-конца к С-концу: ММ-СМ-АВ или АВ-СМ-ММ; где ММ представляет собой пептид, ингибирующий связывание АВ с мишенью, и где ММ не обладает аминокислотной последовательностью природного партнера по связыванию АВ; где, в нерасщепленном, неактивированном состоянии, ММ мешает специфическому связыванию АВ с мишенью, и в расщепленном, активированном состоянии, ММ не создает помехи или конкуренцию специфическому связыванию АВ с мишенью; и где поддающаяся детекции метка расположена на части активируемого антитела, которая высвобождается после расщепления СМ; и (ii) измерения уровня поддающейся детекции метки у субъекта или в образце, где поддающийся детекции уровень поддающейся детекции метки у субъекта или в образце показывает, что расщепляющее средство отсутствует и/или не присутствует в достаточном количестве у субъекта или в образце, и где не поддающийся детекции уровень поддающейся детекции метки у субъекта или в образце показывает, что расщепляющее средство присутствует у субъекта или в образце. В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело представляет собой активируемое антитело, конъюгированное с лекарственным средством. В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело не является конъюгированным со средством. В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело содержит поддающуюся детекции

метку. В некоторых вариантах осуществления поддающаяся детекции метка расположена на АВ. В некоторых вариантах осуществления измерение уровня активируемого антитела у субъекта или в образце осуществляют с использованием вторичного реагента, специфически связывающего активированное антитело, где реагент содержит поддающуюся детекции метку. В некоторых вариантах осуществления, вторичный реагент представляет собой антитело, содержащее поддающуюся детекции метку.

Описание относится также к наборам для применения в способах детекции присутствия или отсутствия расщепляющего средства и мишени у субъекта или в образце, где наборы содержат по меньшей мере одно активируемое антитело и/или конъюгированное активируемое антитело (например, активируемое антитело, конъюгированное с лекарственным средством), описанное в настоящем документе, для применения в контакте с субъектом или биологическим образцом, и средства для детекции уровня активированного активируемого антитела и/или конъюгированного активируемого антитела у субъекта или в биологическом образце, где поддающийся детекции уровень активированного активируемого антитела у субъекта или в биологическом образце показывает, что расщепляющее средство и мишень присутствуют у субъекта или в биологическом образце, и где не поддающийся детекции уровень активированного активируемого антитела у субъекта или в биологическом образце показывает, что расщепляющее средство, мишень или как расщепляющее средство, так и мишень отсутствуют и/или не присутствуют в достаточном количестве у субъекта или в биологическом образце, так что связывание мишени и/или расщепление протеазой активируемого антитела невозможно детектировать у субъекта или в биологическом образце.

Описание относится также к способам детекции присутствия или отсутствия расщепляющего средства у субъекта или в образце посредством (i) приведения субъекта или биологического образца в контакт с активируемым антителом в присутствии мишени, и (ii) измерения уровня активированного активируемого антитела у субъекта или в биологическом образце, где поддающийся детекции уровень активированного активируемого антитела у субъекта или в биологическом образце показывает, что расщепляющее средство присутствует у субъекта или в биологическом образце, и где не поддающийся детекции уровень активированного активируемого антитела у субъекта или в биологическом образце показывает, что расщепляющее средство отсутствует и/или не присутствует в достаточном количестве у субъекта или в биологическом образце на поддающемся детекции уровне, так что расщепление протеазой активируемого антитела невозможно детектировать у субъекта или в биологическом образце. Такое активируемое антитело содержит маскирующую группу (ММ), расщепляемую группу (СМ), расщепляемую посредством расщепляющего средства, например, протеазы, и антигенсвязывающий домен или его фрагмент (АВ), специфически связывающий мишень, где активируемое антитело в нерасщепленном (т.е., неактивированном) состоянии обладает следующей структурной аранжировкой от N-конца к С-концу: ММ-СМ-АВ или АВ-СМ-ММ; (а) где ММ представляет собой пептид, ингибирующий связывание АВ с мишенью, и где ММ не обладает аминокислотной последовательностью природного партнера по связыванию АВ; и (b) где ММ активируемого антитела в нерасщепленном состоянии мешает специфическому связыванию АВ с мишенью, и где ММ активируемого антитела в расщепленном (т.е., активированном) состоянии не создает помехи или конкуренцию специфическому связыванию АВ с мишенью. В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело представляет собой активируемое антитело, конъюгированное с лекарственным средством. В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело не является конъюгированным со средством. В некоторых вариантах осуществления поддающаяся детекции метка присоединена к маскирующей группе. В некоторых вариантах осуществления поддающаяся детекции метка присоединена к расщепляемой группе к N-концу от участка расщепления протеазой. В некоторых вариантах осуществления одиночный антигенсвязывающий участок АВ замаскирован. В некоторых вариантах осуществления, где антитело по этому описанию обладает по меньшей мере двумя антигенсвязывающими участками, где по меньшей мере один антигенсвязывающий участок замаскирован и по меньшей мере один антигенсвязывающий участок не замаскирован. В некоторых вариантах осуществления все антигенсвязывающие участки замаскированы. В некоторых вариантах осуществления стадия измерения включает в себя применение вторичного реагента, содержащего поддающуюся детекции метку.

Описание относится также к наборам для применения в способах детекции присутствия или отсутствия расщепляющего средства и мишени у субъекта или в образце, где наборы содержат по меньшей мере одно активируемое антитело и/или конъюгированное активируемое антитело, описанное в настоящем документе, для применения для приведения в контакт субъекта или биологического образца с активируемым антителом в присутствии мишени, и измерения уровня активированного активируемого антитела у субъекта или в биологическом образце, где поддающийся детекции уровень активированного активируемого антитела у субъекта или в биологическом образце показывает, что расщепляющее средство присутствует у субъекта или в биологическом образце, и где не поддающийся детекции уровень активированного активируемого антитела у субъекта или в биологическом образце показывает, что расщепляющее средство отсутствует и/или не присутствует в достаточном количестве у субъекта или в биологическом образце на поддающемся детекции уровне, так что расщепление протеазой активируемого антитела невозможно детектировать у субъекта или в биологическом образце. Такое активируемое антитело содержит маскирующую группу (ММ), расщепляемую группу (СМ), расщепляемую посредством

расщепляющего средства, например, протеазы, и антигенсвязывающий домен или его фрагмент (АВ), специфически связывающий мишень, где активируемое антитело в нерасщепленном (т.е., неактивированном) состоянии обладает следующей структурной аранжировкой от N-конца к С-концу: ММ-СМ-АВ или АВ-СМ-ММ; (а) где ММ представляет собой пептид, ингибирующий связывание АВ с мишенью, и где ММ не обладает аминокислотной последовательностью природного партнера по связыванию АВ; и (б) где ММ активируемого антитела в нерасщепленном состоянии мешает специфическому связыванию АВ с мишенью, и где ММ активируемого антитела в расщепленном (т.е., активированном) состоянии не создает помехи или конкуренцию специфическому связыванию АВ с мишенью. В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело представляет собой активируемое антитело, конъюгированное с лекарственным средством. В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело не является конъюгированным со средством. В некоторых вариантах осуществления поддающаяся детекции метка присоединена к маскирующей группе. В некоторых вариантах осуществления поддающаяся детекции метка присоединена к расщепляемой группе на N-конце от участка расщепления протеазой. В некоторых вариантах осуществления одиночный антигенсвязывающий участок АВ замаскирован. В некоторых вариантах осуществления, где антитело по этому описанию обладает по меньшей мере двумя антигенсвязывающими участками, по меньшей мере один антигенсвязывающий участок замаскирован, и по меньшей мере один антигенсвязывающий участок не замаскирован. В некоторых вариантах осуществления все антигенсвязывающие участки замаскированы. В некоторых вариантах осуществления стадия измерения включает в себя применение вторичного реагента, содержащего поддающуюся детекции метку.

Описание относится также к наборам для применения в способах детекции присутствия или отсутствия расщепляющего средства у субъекта или в образце, где наборы содержат по меньшей мере одно активируемое антитело и/или конъюгированное активируемое антитело, описанное в настоящем документе, для применения в приведении в контакт с субъектом или биологическим образцом, и средства для детекции уровня активированного активируемого антитела и/или конъюгированного активируемого антитела у субъекта или в биологическом образце, где активируемое антитело содержит поддающуюся детекции метку, расположенную на части активируемого антитела, которая высвобождается после расщепления СМ, где поддающийся детекции уровень активированного активируемого антитела у субъекта или в биологическом образце показывает, что расщепляющее средство отсутствует и/или не присутствует в достаточном количестве у субъекта или в биологическом образце, так что связывание мишени и/или расщепление протеазой активируемого антитела невозможно детектировать у субъекта или в биологическом образце, и где не поддающийся детекции уровень активированного активируемого антитела у субъекта или в биологическом образце показывает, что расщепляющее средство присутствует у субъекта или в биологическом образце на поддающемся детекции уровне.

Описание относится к способам детекции присутствия или отсутствия расщепляющего средства и мишени у субъекта или в образце посредством (i) приведения субъекта или биологического образца с активируемым антителом, где активируемое антитело содержит поддающуюся детекции метку, расположенную на части активируемого антитела, которая высвобождается после расщепления СМ, и (ii) измерения уровня активированного активируемого антитела у субъекта или в биологическом образце, где поддающийся детекции уровень активированного активируемого антитела у субъекта или в биологическом образце показывает, что расщепляющее средство, мишень или как расщепляющее средство, так и мишень, отсутствуют и/или не присутствуют в достаточном количестве у субъекта или в биологическом образце, так что связывание мишени и/или расщепление протеазой активируемого антитела невозможно детектировать у субъекта или в биологическом образце, и где уменьшение поддающегося детекции уровня активированного активируемого антитела у субъекта или в биологическом образце показывает, что расщепляющее средство и мишень присутствуют у субъекта или в биологическом образце. Уменьшение уровня поддающейся детекции метки представляет собой, например, уменьшение на приблизительно 5%, приблизительно 10%, приблизительно 15%, приблизительно 20%, приблизительно 25%, приблизительно 30%, приблизительно 35%, приблизительно 40%, приблизительно 45%, приблизительно 50%, приблизительно 55%, приблизительно 60%, приблизительно 65%, приблизительно 70%, приблизительно 75%, приблизительно 80%, приблизительно 85%, приблизительно 90%, приблизительно 95% и/или приблизительно 100%. Такое активируемое антитело содержит маскирующую группу (ММ), расщепляемую группу (СМ), расщепляемую посредством расщепляющего средства, и антигенсвязывающий домен или его фрагмент (АВ), специфически связывающие мишень, где активируемое антитело в нерасщепленном (т.е., неактивированном) состоянии обладает следующей структурной аранжировкой от N-конца к С-концу: ММ-СМ-АВ или АВ-СМ-ММ; (а) где ММ представляет собой пептид, ингибирующий связывание АВ с мишенью и где ММ не обладает аминокислотной последовательностью природного партнера по связыванию АВ; и (б) где ММ активируемого антитела в нерасщепленном состоянии мешает специфическому связыванию АВ с мишенью, и где ММ активируемого антитела в расщепленном (т.е., активированном) состоянии не создает помехи или конкуренцию специфическому связыванию АВ с мишенью. В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело представляет собой активируемое антитело, конъюгированное с лекарственным средством. В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело не является конъюгированным со средством. В некоторых вариантах осуществления

активируемое антитело содержит поддающуюся детекции метку. В некоторых вариантах осуществления поддающаяся детекции метка расположена на АВ. В некоторых вариантах осуществления измерение уровня активируемого антитела у субъекта или в образце осуществляют с использованием вторичного реагента, специфически связывающего активированное антитело, где реагент содержит поддающуюся детекции метку. В некоторых вариантах осуществления вторичный реагент представляет собой антитело, содержащее поддающуюся детекции метку.

Описание относится также к наборам для применения в способах детекции присутствия или отсутствия расщепляющего средства и мишени у субъекта или в образце, где наборы содержат по меньшей мере одно активируемое антитело и/или конъюгированное активируемое антитело, описанное в настоящем документе, для применения для приведения в контакт с субъектом или биологическим образцом, и средства для детекции уровня активированного активируемого антитела и/или конъюгированного активируемого антитела у субъекта или в биологическом образце, где поддающийся детекции уровень активированного активируемого антитела у субъекта или в биологическом образце показывает, что расщепляющее средство, мишень или как расщепляющее средство, так и мишень, отсутствует и/или не присутствует в достаточном количестве у субъекта или в биологическом образце, так что связывание мишени и/или расщепление протеазой активируемого антитела невозможно детектировать у субъекта или в биологическом образце, и где уменьшение поддающегося детекции уровня активированного активируемого антитела у субъекта или в биологическом образце показывает, что расщепляющее средство и мишень присутствуют у субъекта или в биологическом образце. Уменьшение уровня поддающейся детекции метки представляет собой, например, уменьшение на приблизительно 5%, приблизительно 10%, приблизительно 15%, приблизительно 20%, приблизительно 25%, приблизительно 30%, приблизительно 35%, приблизительно 40%, приблизительно 45%, приблизительно 50%, приблизительно 55%, приблизительно 60%, приблизительно 65%, приблизительно 70%, приблизительно 75%, приблизительно 80%, приблизительно 85%, приблизительно 90%, приблизительно 95% и/или приблизительно 100%.

Описание относится также к способам детекции присутствия или отсутствия расщепляющего средства у субъекта или в образце посредством (i) приведения субъекта или биологического образца в контакт с активируемым антителом, где активируемое антитело содержит поддающуюся детекции метку, расположенную на части активируемого антитела, которая высвобождается после расщепления СМ; и (ii) измерения уровня поддающейся детекции метки у субъекта или в биологическом образце, где поддающийся детекции уровень поддающейся детекции метки у субъекта или в биологическом образце показывает, что расщепляющее средство отсутствует и/или не присутствует в достаточном количестве у субъекта или в биологическом образце на поддающемся детекции уровне, так что расщепление протеазой активируемого антитела невозможно детектировать у субъекта или в биологическом образце, и где уменьшение поддающегося детекции уровня поддающейся детекции метки у субъекта или в биологическом образце показывает, что расщепляющее средство присутствует у субъекта или в биологическом образце. Уменьшение уровня поддающейся детекции метки представляет собой, например, уменьшение на приблизительно 5%, приблизительно 10%, приблизительно 15%, приблизительно 20%, приблизительно 25%, приблизительно 30%, приблизительно 35%, приблизительно 40%, приблизительно 45%, приблизительно 50%, приблизительно 55%, приблизительно 60%, приблизительно 65%, приблизительно 70%, приблизительно 75%, приблизительно 80%, приблизительно 85%, приблизительно 90%, приблизительно 95% и/или приблизительно 100%. Такое активируемое антитело содержит маскирующую группу (ММ), расщепляемую группу (СМ), расщепляемую посредством расщепляющего средства, и антигенсвязывающий домен или его фрагмент (АВ), специфически связывающий мишень, где активируемое антитело в нерасщепленном (т.е., неактивированном) состоянии обладает следующей структурной аранжировкой от N-конца к С-концу: ММ-СМ-АВ или АВ-СМ-ММ; (а) где ММ представляет собой пептид, ингибирующий связывание АВ с мишенью, и где ММ не обладает аминокислотной последовательностью природного партнера по связыванию АВ; и (b) где ММ активируемого антитела в нерасщепленном состоянии мешает специфическому связыванию АВ с мишенью, и где ММ активируемого антитела в расщепленном (т.е., активированном) состоянии не создает помехи или конкуренцию специфическому связыванию АВ с мишенью. В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело представляет собой активируемое антитело, конъюгированное с лекарственным средством. В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело не является конъюгированным со средством. В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело содержит поддающуюся детекции метку. В некоторых вариантах осуществления измерение уровня активируемого антитела у субъекта или в образце осуществляют с использованием вторичного реагента, специфически связывающего активированное антитело, где реагент содержит поддающуюся детекции метку. В некоторых вариантах осуществления вторичный реагент представляет собой антитело, содержащее поддающуюся детекции метку.

Описание относится также к наборам для применения в способах детекции присутствия или отсутствия представляющего интерес расщепляющего средства у субъекта или в образце, где наборы содержат по меньшей мере одно активируемое антитело и/или конъюгированное активируемое антитело, описанные в настоящем документе, для применения в приведении в контакт с субъектом или биологическим

образцом, и средства для детекции уровня активированного активируемого антитела и/или конъюгированного активируемого антитела у субъекта или в биологическом образце, где активируемое антитело содержит поддающуюся детекции метку, расположенную на части активируемого антитела, которая высвобождается после расщепления СМ, где поддающийся детекции уровень поддающейся детекции метки у субъекта или в биологическом образце показывает, что расщепляющее средство, мишень или как расщепляющее средство, так и мишень отсутствуют и/или не присутствует в достаточном количестве у субъекта или в биологическом образце, так что связывание мишени и/или расщепление протеазой активируемого антитела невозможно детектировать у субъекта или в биологическом образце, и где уменьшение поддающегося детекции уровня поддающейся детекции метки у субъекта или в биологическом образце показывает, что расщепляющее средство и мишень присутствуют у субъекта или в биологическом образце. Уменьшение уровня поддающейся детекции метки представляет собой, например, уменьшение на приблизительно 5%, приблизительно 10%, приблизительно 15%, приблизительно 20%, приблизительно 25%, приблизительно 30%, приблизительно 35%, приблизительно 40%, приблизительно 45%, приблизительно 50%, приблизительно 55%, приблизительно 60%, приблизительно 65%, приблизительно 70%, приблизительно 75%, приблизительно 80%, приблизительно 85%, приблизительно 90%, приблизительно 95% и/или приблизительно 100%.

В некоторых вариантах осуществления этих способов и наборов активируемое антитело содержит поддающуюся детекции метку. В некоторых вариантах осуществления этих способов и наборов поддающаяся детекции метка включает в себя средство для визуализации, контрастирующее средство, фермент, флуоресцентную метку, хромофор, краситель, один или несколько ионов металла или метку на основе лиганда. В некоторых вариантах осуществления этих способов и наборов средство для визуализации содержит радиоактивный изотоп. В некоторых вариантах осуществления этих способов и наборов радиоактивный изотоп представляет собой индий или технеций. В некоторых вариантах осуществления этих способов и наборов контрастирующее средство содержит иод, гадолиний или оксид железа. В некоторых вариантах осуществления этих способов и наборов фермент содержит пероксидазу хрена, щелочную фосфатазу, или β -галактозидазу. В некоторых вариантах осуществления этих способов и наборов флуоресцентная метка содержит желтый флуоресцентный белок (YFP), голубой флуоресцентный белок (CFP), зеленый флуоресцентный белок (GFP), модифицированный красный флуоресцентный белок (mRFP), димер-2 красного флуоресцентного белка (RFP t димер2), HCREG или производное европия. В некоторых вариантах осуществления этих способов и наборов люминесцентная метка содержит производное N-метилакридиния. В некоторых вариантах осуществления этих способов, метка содержит метку Alexa Fluor®, такую как Alex Fluor® 680 или Alexa Fluor® 750. В некоторых вариантах осуществления этих способов и наборов метка на основе лиганда содержит биотин, авидин, стрептавидин или один или несколько гаптенев.

В некоторых вариантах осуществления этих способов и наборов субъект представляет собой млекопитающее. В некоторых вариантах осуществления этих способов и наборов субъект представляет собой человека. В некоторых вариантах осуществления субъект представляет собой не относящегося к человеку млекопитающего, такого как нечеловекообразный примат, животное-компаньона (например, кошку, собаку, лошадь), сельскохозяйственное животное, рабочее животное или животное зоопарка. В некоторых вариантах осуществления субъект представляет собой грызуна.

В некоторых вариантах осуществления этих способов представляет собой способ *in vivo*. В некоторых вариантах осуществления этих способов способ представляет собой способ *in situ*. В некоторых вариантах осуществления этих способов способ представляет собой способ *ex vivo*. В некоторых вариантах осуществления этих способов способ представляет собой способ *in vitro*.

В некоторых вариантах осуществления визуализацию *in situ* и/или визуализацию *in vivo* можно использовать в способах идентификации пациентов, подлежащих лечению. Например, при визуализации *in situ*, активируемые антитела используют для скрининга образцов от пациентов для идентификации пациентов, обладающих подходящей протеазой (протеазами) и мишенью (мишенями) в подходящей локализации, например, в участке опухоли.

В некоторых вариантах осуществления визуализацию *in situ* используют для идентификации или иным образом уточнения популяции пациентов, подходящей для лечения с использованием активируемого антитела по этому описанию. Например, пациентов с положительным тестом как на мишень (например, эту мишень), так и на протеазу, расщепляющую субстрат в расщепляемой группе (СМ) тестируемого активируемого антитела (например, с накоплением активированного антитела в участке заболевания), идентифицируют как подходящих кандидатов для лечения с использованием такого активируемого антитела, содержащего такую СМ. Подобным образом, пациентов с отрицательным тестом на любую или обе из мишени (например, этой мишени) и протеазы, расщепляющей субстрат в СМ в активируемом антителе, протестированных с использованием этих способов, можно идентифицировать как подходящих кандидатов для другой формы терапии. В некоторых вариантах осуществления таких пациентов с отрицательным тестом по отношению к первому активируемому антителу можно тестировать с использованием других активируемых антител, содержащих другие СМ, пока не идентифицируют подходящее

активируемое антитело для лечения (например, активируемое антитело, содержащее СМ, расщепляемую пациентом в участке заболевания). В некоторых вариантах осуществления пациенту затем вводят терапевтически эффективное количество активируемого антитела, для которого пациент тестирован как положительный.

В некоторых вариантах осуществления визуализацию *in vivo* используют для идентификации или иным образом уточнения популяции пациентов, подходящей для лечения с использованием активируемого антитела по этому описанию. Например, пациентов с положительным тестом как на мишень (например, эту мишень), так и на протеазу, расщепляющую субстрат в расщепляемой группе (СМ) тестируемого активируемого антитела (например, с накоплением активированного антитела в участке заболевания) идентифицируют как подходящих кандидатов для лечения с использованием такого активируемого антитела, содержащего такую СМ. Подобным образом, пациентов с отрицательным тестом можно идентифицировать как подходящих кандидатов для другой формы терапии. В некоторых вариантах осуществления таких пациентов с отрицательным тестом по отношению к первому активируемому антителу, можно тестировать с использованием других активируемых антител, содержащих другие СМ, пока не идентифицируют подходящее активируемое антитело для лечения (например, активируемое антитело, содержащее СМ, расщепляемую пациентом в участке заболевания). В некоторых вариантах осуществления пациенту затем вводят терапевтически эффективное количество активируемого антитела, для которого пациент тестирован как положительный.

В некоторых вариантах осуществления способов и наборов способ или набор используют для идентификации или иным образом уточнения популяции пациентов, подходящей для лечения с использованием активируемого антитела по этому описанию. Например, пациентов с положительным тестом как на мишень (например, эту мишень), так и на протеазу, расщепляющую субстрат в расщепляемой группе (СМ) активируемого антитела, тестируемого в этих способах идентифицируют как подходящих кандидатов для лечения с использованием такого активируемого антитела, содержащего такую СМ. Подобным образом, пациентов с отрицательным тестом как на мишени (например, эту мишень), так и на протеазу, расщепляющую субстрат в СМ в активируемом антителе, тестированном с использованием этих способов, можно идентифицировать как подходящих кандидатов для другой формы терапии. В некоторых вариантах осуществления таких пациентов можно тестировать с использованием других активируемых антител, пока не идентифицируют подходящее активируемое антитело для лечения (например, активируемое антитело, содержащее СМ, расщепляемую пациентом в участке заболевания). В некоторых вариантах осуществления пациентов с отрицательным тестом на любую мишень (например, эту мишень) идентифицируют как подходящих кандидатов для лечения с использованием такого активируемого антитела, содержащего такую СМ. В некоторых вариантах осуществления пациентов с отрицательным тестом на любую мишень (например, эту мишень) идентифицируют как не являющихся подходящими кандидатами для лечения с использованием такого активируемого антитела, содержащего такую СМ. В некоторых вариантах осуществления таких пациентов можно тестировать с использованием других активируемых антител, пока не идентифицируют подходящее активируемое антитело для лечения (например, активируемое антитело, содержащее СМ, расщепляемую пациентом в участке заболевания). В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело представляет собой активируемое антитело, конъюгированное с лекарственным средством. В некоторых вариантах осуществления, активируемое антитело не является конъюгированным со средством. В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело содержит поддающуюся детекции метку. В некоторых вариантах осуществления, поддающаяся детекции метка расположена на АВ. В некоторых вариантах осуществления измерение уровня активируемого антитела у субъекта или в образце осуществляют с использованием вторичного реагента, специфически связывающего активированное антитело, где реагент содержит поддающуюся детекции метку. В некоторых вариантах осуществления вторичный реагент представляет собой антитело, содержащее поддающуюся детекции метку.

В некоторых вариантах осуществления способ или набор используют для идентификации или иным образом уточнения популяции пациентов, подходящей для лечения с использованием активируемого антитела и/или конъюгированного активируемого антитела (например, активируемого антитела, конъюгированного с лекарственным средством) против мишени по этому описанию, с последующим лечением посредством введения этого активируемого антитела и/или конъюгированного активируемого антитела нуждающемуся в этом субъекту. Например, пациентов с положительным тестом как на мишени (например, эту мишень), так и на протеазу, расщепляющую субстрат в расщепляемой группе (СМ) активируемого антитела и/или конъюгированного активируемого антитела, тестированного в этих способах, идентифицируют как подходящих кандидатов для лечения с использованием такого антитела и/или такого конъюгированного активируемого антитела, содержащего такую СМ, и затем пациенту вводят терапевтически эффективное количество тестируемого активируемого антитела и/или конъюгированного активируемого антитела. Подобным образом пациентов с отрицательным тестом для любой или обеих из мишени (например, этой мишени) и протеазы, расщепляющей субстрат в СМ в активируемом антителе, тестируемом с использованием этих способов, можно идентифицировать как подходящих кандидатов для другой формы терапии. В некоторых вариантах осуществления таких пациентов можно тестировать с

использованием другого антитела и/или конъюгированного активируемого антитела, пока не идентифицируют подходящее антитело и/или конъюгированное активируемое антитело для лечения (например, активируемое антитело и/или конъюгированное активируемое антитело, содержащее СМ, расщепляемую пациентом в участке заболевания). В некоторых вариантах осуществления пациенту затем вводят терапевтически эффективное количество активируемого антитела и/или конъюгированного активируемого антитела, для которого пациент тестирован как положительный.

В некоторых вариантах осуществления этих способов и наборов, ММ представляет собой пептид, имеющий длину приблизительно от 4 до 40 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления этих способов и наборов, активируемое антитело содержит линкерный пептид, где линкерный пептид расположен между ММ и СМ. В некоторых вариантах осуществления этих способов и наборов, активируемое антитело содержит линкерный пептид, где линкерный пептид расположен между АВ и СМ. В некоторых вариантах осуществления этих способов и наборов, активируемое антитело содержит первый линкерный пептид (L1) и второй линкерный пептид (L2), где первый линкерный пептид расположен между ММ и СМ, и второй линкерный пептид расположен между АВ и СМ. В некоторых вариантах осуществления этих способов и наборов, каждый из L1 и L2 представляет собой пептид длиной приблизительно 1-20 аминокислот, и где каждый из L1 и L2 не обязательно представляют собой один и тот же линкер. В некоторых вариантах осуществления этих способов и наборов, один или оба из L1 и L2 содержит глицин-сериновый полимер. В некоторых вариантах осуществления этих способов и наборов по меньшей мере один из L1 и L2 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из (GS)_n, (GSGGS)_n (SEQ ID NO: 339) и (GGGS)_n (SEQ ID NO: 340), где n представляет собой целое число по меньшей мере один. В некоторых вариантах осуществления этих способов и наборов по меньшей мере один из L1 и L2 содержит аминокислотную последовательность, обладающую формулой (GGS)_n, где n представляет собой целое число по меньшей мере один. В некоторых вариантах осуществления этих способов и наборов по меньшей мере один из L1 и L2 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из Gly-Gly-Ser-Gly (SEQ ID NO: 341), Gly-Gly-Ser-Gly-Gly (SEQ ID NO: 342), Gly-Ser-Gly-Ser-Gly (SEQ ID NO: 343), Gly-Ser-Gly-Gly-Gly (SEQ ID NO: 344), Gly-Gly-Gly-Ser-Gly (SEQ ID NO: 345) и Gly-Ser-Ser-Ser-Gly (SEQ ID NO: 346).

В некоторых вариантах осуществления этих способов и наборов АВ содержит последовательность антитела или фрагмента антитела, выбранную из последовательностей антител с перекрестной реакционной способностью, представленных в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления этих способов и наборов АВ содержит фрагмент Fab, scFv или одноцепочечное антитело (scAb).

В некоторых вариантах осуществления этих способов и наборов расщепляющее средство представляет собой протеазу, локализованную совместно с мишенью у субъекта или в образце, и СМ представляет собой полипептид, функционирующий в качестве субстрата для протеазы, где протеаза расщепляет СМ в активируемом антителе, когда активируемое антитело подвергают воздействию протеазы. В некоторых вариантах осуществления этих способов и наборов СМ представляет собой полипептид длиной вплоть до 15 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления этих способов и наборов СМ присоединена к N-концу АВ. В некоторых вариантах осуществления этих способов и наборов СМ присоединена к C-концу АВ. В некоторых вариантах осуществления этих способов и наборов СМ присоединена к N-концу цепи VL АВ.

Антитела, конъюгированные антитела, активируемые антитела и/или конъюгированные активируемые антитела по этому описанию используют в диагностических и профилактических составах. В одном варианте осуществления активируемое антитело вводят пациентам, подверженным риску развития одного или нескольких из вышеупомянутых воспаления, воспалительных нарушений, злокачественной опухоли или других нарушений.

Предрасположенность пациента или органа к одному или нескольким из вышеупомянутых нарушений можно определять с использованием генотипических, серологических или биохимических маркеров.

В некоторых вариантах осуществления по этому описанию антитело, конъюгированное антитело, активируемое антитело и/или конъюгированное активируемое антитело вводят индивидуумам-людям с диагностированным клиническим показателем, ассоциированным с одним или несколькими из вышеупомянутых нарушений. После диагностики антитело, конъюгированное антитело, активируемое антитело и/или конъюгированное активируемое антитело вводят для смягчения или обращения эффектов клинического показателя.

Антитела, конъюгированные антитела, активируемые антитела и/или конъюгированные активируемые антитела по этому описанию можно также использовать для детекции мишени в образцах от пациентов и, соответственно, можно использовать в качестве диагностических средств. Например, антитела, конъюгированные антитела, активируемые антитела и/или конъюгированные активируемые антитела по этому описанию используют в анализах *in vitro*, например, ELISA, для детекции уровней мишени в образце от пациента.

В одном варианте осуществления антитело и/или активируемое антитело по этому описанию иммобилизуют на твердой подложке (например, в лунке(лунках) микропланшета для титрования). Иммобилизованное антитело и/или активируемое антитело служит в качестве связывающего антитела для любой

мишени, которая может присутствовать в тестируемом образце. Перед приведением иммобилизованного антитела и/или активируемого антитела в контакт с образцом от пациента твердую подложку промывают и обрабатывают с использованием блокирующего средства, такого как молочный белок или альбумин, для предотвращения неспецифической адсорбции аналита.

Затем лунки обрабатывают тестируемым образцом, как подозревают, содержащим антиген, или раствором, содержащим стандартное количество антигена. Такой образец представляет собой, например, образец сыворотки от субъекта, как подозревают, обладающего уровнями циркулирующего антигена, рассматриваемыми как диагностические для патологии. После отмывки тестируемого образца или стандарта твердую подложку обрабатывают вторичным антителом, меченным поддающейся детекции меткой. Меченное вторичное антитело служит в качестве детектирующего антитела. Измеряют уровень поддающейся детекции метки, и концентрацию антигена-мишени в тестируемом образце определяют посредством сравнения со стандартной кривой, полученной для стандартных образцов.

Следует понимать, что на основании результатов, полученных с использованием антител и/или активируемых антител по этому описанию в диагностическом анализе *in vitro*, можно определять стадию заболевания у субъекта на основании уровней экспрессии антигена-мишени. Для данного заболевания образцы крови отбирают у субъектов, диагностированных как находящихся на различных стадиях прогрессирования заболевания, и/или в различных точках терапевтического лечения заболевания. С использованием популяции образцов, обеспечивающей статистически значимые результаты для каждой стадии прогрессирования или терапии, разрабатывают диапазон концентраций антигена, который можно считать характерным для каждой стадии.

Антитела, конъюгированные антитела, активируемые антитела и/или конъюгированные активируемые антитела можно также использовать в способах диагностики и/или визуализации. В некоторых вариантах осуществления такие способы представляют собой способы *in vitro*. В некоторых вариантах осуществления такие способы представляют собой способы *in vivo*. В некоторых вариантах осуществления такие способы представляют собой способы *in situ*. В некоторых вариантах осуществления такие способы представляют собой способы *ex vivo*. Например, активируемые антитела обладающие ферментативно расщепляемыми СМ, можно использовать для детекции присутствия или отсутствия фермента, способного расщеплять СМ. Такие активируемые антитела можно использовать в диагностике, которая может включать в себя детекцию *in vivo* (например, качественную или количественную) of активности фермента (или, в некоторых вариантах осуществления, окружающей среды с увеличенным восстановительным потенциалом, такого как тот, что может обеспечивать восстановление дисульфидной связи) посредством измерения накопления активированных антител (т.е., антител, возникающих в результате расщепления активируемого антитела) в данной клетке или ткани данного организма-хозяина. Такое накопление активированных антител указывает не только на то, что ткань обладает ферментативной активностью (или увеличенным восстановительным потенциалом, в зависимости от природы СМ), но также на то, что ткань экспрессирует мишень, с которой связывается активированное антитело.

Например, можно выбирать СМ, чтобы она являлась субстратом протеазы для протеазы, обнаруженной в участке опухоли, в участке вирусной или бактериальной инфекции в биологически ограниченном участке (например, при абсцессе, в органе и т.п.), и т.п. АВ может представлять собой АВ, связывающий антиген-мишень. С использованием способов, известных специалисту в данной области, поддающуюся детекции метку (например, флуоресцентную метку или радиоактивную метку или радиоактивный индикатор) можно конъюгировать с АВ или другой областью активируемого антитела. Пригодные поддающиеся детекции метки обсуждают в контексте вышеуказанных способов скрининга, и дополнительные конкретные примеры представлены ниже. С использованием АВ, специфического для белка или пептида в состоянии заболевания, вместе с по меньшей мере одной протеазой, активность которой повышена в представляющей интерес пораженной заболеванием ткани, активируемые антитела обладают увеличенной скоростью связывания с пораженной заболеванием тканью по сравнению с тканями, где специфический для СМ фермент не присутствует на поддающемся детекции уровне или присутствует на более низком уровне, чем в пораженной заболеванием ткани, или является неактивным (например, в форме зимогена или в комплексе с ингибитором). Поскольку небольшие белки и пептиды быстро выводятся из крови посредством системы фильтрации почек, и поскольку фермент, специфический для СМ, не присутствует на поддающемся детекции уровне (или присутствует на более низких уровнях в не пораженных заболеванием тканях, или присутствует в неактивной конформации), накопление активированных антител в пораженной заболеванием ткани увеличено по сравнению с не пораженными заболеванием тканями.

В другом примере активируемые антитела можно использовать для детекции присутствия или отсутствия расщепляющего средства в образце. Например, где активируемые антитела содержат СМ, чувствительную к расщеплению ферментом, активируемые антитела можно использовать для детекции (либо качественно, либо количественно) присутствия фермента в образце. В другом примере, где активируемые антитела содержат СМ, чувствительную к расщеплению восстанавливающим средством, активируемые антитела можно использовать для детекции (либо качественно, либо количественно) присутствия восстанавливающих условий в образце. Для облегчения анализа в этих способах активируемые антитела

можно метить поддающейся детекции меткой, и можно связывать с подложкой (например, твердой подложкой, такой как стекло или бусина). Поддающуюся детекции метку можно располагать на части активируемого антитела, которая не высвобождается после расщепления, например, поддающаяся детекции метка может представлять собой погашенную флуоресцентную метку или другую метку, которая не поддается детекции, пока не произойдет расщепление. Анализ можно проводить, например, посредством приведения иммобилизованных, меченных поддающейся детекции меткой активируемых антител в контакт с образцом, как подозревают, содержащим фермент и/или восстанавливающее средство, в течение времени, достаточного, чтобы произошло расщепление, затем промывки для удаления избытка образца и загрязняющих примесей. Присутствие или отсутствие расщепляющего средства (например, фермента или восстанавливающего средства) в образце затем оценивают посредством изменения поддающегося детекции сигнала активируемых антител до контакта с образцом, например, присутствия и/или увеличения поддающегося детекции сигнала из-за расщепления активируемого антитела посредством расщепляющего средства в образце.

Такие способы детекции можно адаптировать, чтобы обеспечивать также детекцию присутствия или отсутствия мишени, способной связывать АВ активируемых антител при расщеплении. Таким образом, анализы можно адаптировать для оценки присутствия или отсутствия расщепляющего средства и присутствия или отсутствия представляющей интерес мишени. Присутствие или отсутствие расщепляющего средства можно детектировать по присутствию и/или увеличению количества поддающейся детекции метки из активируемых антител, как описано выше, и присутствие или отсутствие мишени можно детектировать посредством детекции комплекса мишень-АВ, например, посредством использования меченого поддающейся детекции меткой антитела против мишени.

Активируемые антитела также можно использовать для визуализации *in situ* для подтверждения активации активируемого антитела, например, посредством расщепления протеазой, и связывания с конкретной мишенью. Визуализация *in situ* представляет собой способ, позволяющий локализацию протеолитической активности и мишени биологических образцах, таких как культуры клеток или срезы тканей. С использованием этого способа можно подтверждать как связывание с данной мишенью, так и протеолитическую активность, на основании присутствия поддающейся детекции метки (например, флуоресцентной метки).

Эти способы можно использовать для любых замороженных клеток или ткани, полученных из участка заболевания (например, ткани опухоли), или здоровых тканей. Эти способы можно также использовать для свежих образцов клеток или ткани.

В этих способах активируемое антитело метят поддающейся детекции меткой. Поддающаяся детекции метка может представлять собой флуоресцентный краситель, (например, изотиоцианат флуоресцеина (FITC), изотиоцианат родамина (TRITC), краситель в ближней инфракрасной (NIR) области спектра (например, нанокристаллы Qdot®), коллоидный металл, гаптен, радиоактивный маркер, биотин и усиливающее средство, такое как стрептавидин, или фермент (например, пероксидаза хрена или щелочная фосфатаза).

Детекция метки в образце, который инкубировали с меченым, активируемым антителом, показывает, что образец содержит мишень и содержит протеазу, которая является специфической для СМ активируемого антитела. В некоторых вариантах осуществления присутствие протеазы можно подтверждать с использованием широкого спектра ингибиторов протеаз, таких как описанные в настоящем документе, и/или с использованием средства, специфического для протеазы, например, антитела, такого как А11, которое является специфическим для протеазы матрипазы и ингибирует протеолитическую активность матрипазы; См., например, Международную публикацию № WO 2010/129609, опубликованную 11 ноября 2010 г. Такой же способ с использованием широкого спектра ингибиторов протеаз, таких как описанные в настоящем документе, и/или с использованием более избирательного ингибирующего средства, можно использовать для идентификации протеазы или класса протеаз, специфических для СМ активируемого антитела. В некоторых вариантах осуществления присутствие мишени можно подтверждать с использованием средства, специфического для мишени, например, другое антитело, или поддающаяся детекции метка может конкурировать с немеченой мишенью. В некоторых вариантах осуществления можно использовать немеченое активируемое антитело, с детекцией посредством меченого вторичного антитела или более сложной системы детекции.

Сходные способы можно также использовать для визуализации *in vivo*, где детекция флуоресцентного сигнала у субъекта, например, млекопитающего, включая человека, указывает на то, что участок заболевания содержит мишень и содержит протеазу, специфическую для СМ активируемого антитела.

Эти способы можно также использовать в наборах и/или в качестве реагентов для детекции, идентификации или характеристики протеазной активности во множестве клеток, тканей и организмов на основании специфической для протеазы СМ в активируемом антителе.

В некоторых вариантах осуществления визуализацию *in situ* и/или визуализацию *in vivo* можно использовать в способах идентификации пациентов, подлежащих лечению. Например, при визуализации *in situ*, активируемые антитела используют для скрининга образцов от пациентов для идентификации пациентов, обладающих подходящей протеазой (протеазами) и мишенью (мишенями) в подходящей локали-

зации, например, в участке опухоли.

В некоторых вариантах осуществления визуализацию *in situ* используют для идентификации или иным образом уточнения популяции пациентов, подходящей для лечения с использованием активируемого антитела по этому описанию. Например, пациентов с положительным тестом как на мишень, так и на протеазу, расщепляющую субстрат в расщепляемой группе (СМ) тестируемого активируемого антитела (например, с накоплением активированного антитела в участке заболевания) идентифицируют как подходящих кандидатов для лечения с использованием такого активируемого антитела, содержащего такую СМ. Подобным образом, пациентов с отрицательным тестом на любую или обе из мишени и протеазы, расщепляющей субстрат в СМ в активируемом антителе, протестированных с использованием этих способов, идентифицируют как подходящих кандидатов для другой формы терапии (т.е., как не подходящих для лечения с использованием тестируемого активируемого антитела). В некоторых вариантах осуществления таких пациентов с отрицательным тестом по отношению к первому активируемому антителу, можно тестировать с использованием других активируемых антител, содержащих другие СМ, пока не идентифицируют подходящее активируемое антитело для лечения (например, активируемое антитело, содержащее СМ, расщепляемую пациентом в участке заболевания).

В некоторых вариантах осуществления визуализацию *in vivo* используют для идентификации или иным образом уточнения популяции пациентов, подходящей для лечения с использованием активируемого антитела по этому описанию. Например, пациентов с положительным тестом как на мишень, так и на протеазу, расщепляющую субстрат в расщепляемой группе (СМ) тестируемого активируемого антитела (например, с накоплением активированного антитела в участке заболевания) идентифицируют как подходящих кандидатов для лечения с использованием такого активируемого антитела, содержащего такую СМ. Подобным образом, пациентов с отрицательным тестом идентифицируют как подходящих кандидатов для другой формы терапии (т.е., как не подходящих для лечения с использованием тестируемого активируемого антитела). В некоторых вариантах осуществления таких пациентов с отрицательным тестом по отношению к первому активируемому антителу можно тестировать с использованием других активируемых антител, содержащих другие СМ, пока не идентифицируют подходящее активируемое антитело для лечения (например, активируемое антитело, содержащее СМ, расщепляемую пациентом в участке заболевания).

Фармацевтические композиции

Антитела, конъюгированные антитела, активируемые антитела и/или конъюгированные активируемые антитела по этому описанию (также обозначаемые в настоящем документе как "активные соединения"), и их производные, фрагменты, аналоги и гомологи, можно включать в фармацевтические композиции, пригодные для введения. Такие композиции, как правило, содержат антитело, конъюгированное антитело, активируемое антитело и/или конъюгированное активируемое антитело и фармацевтически приемлемый носитель. Как применяют в настоящем документе, термин "фармацевтически приемлемый носитель" предназначен для включения всех без исключения растворителей, диспергирующих сред, порошков, антибактериальных и противогрибковых средств, изотонических и замедляющих абсорбцию средств, и т.п., совместимых с фармацевтическим введением. Пригодные носители описаны в наиболее недавнем издании Remington's Pharmaceutical Sciences, стандартного справочника в данной области, содержание которого приведено в настоящем документе в качестве ссылки. Пригодные примеры таких носителей или разбавителей включают в себя, но без ограничения, воду, солевой раствор, растворы Рингера, раствор декстрозы и 5% человеческий сывороточный альбумин. Липосомы и неводные носители, такие как жирные масла, также можно использовать. Применение таких сред и средств для фармацевтически активных веществ хорошо известно в данной области. За исключением случаев, когда любые общепринятые среда или средство являются несовместимыми с активным соединением, предусматривают их использование в композициях. Дополнительные активные соединения также можно включать в композиции.

Фармацевтическую композицию по этому описанию составляют, чтобы она была совместимой с намеченным для нее способом введения. Примеры способов введения включают в себя парентеральное, например, внутривенное, внутривожное, подкожное, пероральное (например, ингаляция), чрескожное (т.е., местное), трансмукозальное и ректальное введение. Растворы или суспензии, используемые для парентерального, внутривожного или подкожного применения, могут включать следующие компоненты: стерильный разбавитель, такой как вода для инъекций, солевой раствор, жирные масла, полиэтиленгликоли, глицерин, пропиленгликоль или другие синтетические растворители; антибактериальные средства, такие как бензиловый спирт или метилпарабены; антиоксиданты, такие как аскорбиновая кислота или бисульфит натрия; хелатирующие агенты, такие как этилендиаминтетрауксусная кислота (EDTA); буферы, такие как ацетаты, цитраты или фосфаты, и средства для регуляции тоничности, такие как хлорид натрия или декстроза. pH можно регулировать с использованием кислот или оснований, таких как соляная кислота или гидроксид натрия. Парентеральные препараты можно заключать в ампулы, одноразовые шприцы или флаконы для множественных доз, изготовленных из стекла или пластика.

Фармацевтические композиции, пригодные для применения для инъекций, включают в себя стерильные водные растворы (когда являются водорастворимыми) или дисперсии и стерильные порошки

для приготовления непосредственно перед введением стерильных пригодных для инъекции растворов или дисперсий. Для внутривенного введения пригодные носители включают в себя физиологический солевой раствор, бактериостатическую воду, Кремофор EL™ (BASF, Parsippany, N.J.) или фосфатно-солевой буфер (PBS). Во всех случаях композиция должна являться стерильной и должна являться текучей до такой степени, чтобы существовала возможность легкого введения через шприц. Она должна являться стабильной в условиях изготовления и хранения, и должна являться защищенной от загрязняющего действия микроорганизмов, таких как бактерии и грибы. Носитель может представлять собой растворитель или диспергирующую среду, содержащую, например, воду, этанол, полиол (например, глицерин, пропиленгликоль и жидкий полиэтиленгликоль, и т.п.), и их пригодные смеси. Надлежащую текучесть можно поддерживать, например, посредством применения покрытия, такого как лецитин, посредством поддержания необходимого размера частиц в случае дисперсии и посредством применения поверхностно-активных веществ. Предотвращения действия микроорганизмов можно достигать посредством различных антибактериальных и противогрибковых средств, например, парабенов, хлорбутанола, фенола, аскорбиновой кислоты, тимеросала и т.п. В некоторых вариантах осуществления может являться желательным включение изотонических средств, например сахаров, полиспиртов, таких как манит, сорбит, хлорид натрия в композицию. Продленную абсорбцию пригодных для инъекции композиций можно осуществлять посредством включения в композицию средства, замедляющего абсорбцию, например, моностеарата алюминия и желатина.

Стерильные пригодные для инъекций растворы можно получать посредством введения активного соединения в необходимом количестве подходящего растворителя с одним или комбинацией ингредиентов, перечисленных выше, по необходимости, с последующей стерилизацией фильтрацией. В общем, дисперсии получают посредством введения активного соединения в стерильный носитель, содержащий базовую диспергирующую среду и необходимые ингредиенты, отличные от перечисленных выше. В случае стерильных порошков для получения стерильных пригодных для инъекции растворов способы получения представляют собой вакуумную сушку и лиофилизацию для получения порошка активного ингредиента плюс любого дополнительного желательного ингредиента из его предварительно простерилизованного фильтрацией раствора.

Пероральные композиции, как правило, включают в себя инертный разбавитель или съедобный носитель. Их можно также заключать в желатиновые капсулы или прессовать в таблетки. Для целей перорального терапевтического введения, активное соединение можно включать с наполнителями и использовать в форме таблеток, лепешек или капсул. Пероральные композиции можно также получать с использованием жидкого носителя для применения в форме ополаскивателя для полости рта, где соединение в жидком носителе применяют перорально и прополаскивают и выплевывают или проглатывают. Фармацевтически совместимые связующие вещества и/или вспомогательные материалы можно включать в качестве части композиции. Таблетки, пилюли, капсулы, лепешки и т.п. могут содержать любые из следующих ингредиентов или соединений сходной природы: связующее вещество, такое как микрокристаллическая целлюлоза, трагакантовая камедь или желатин; наполнитель, такой как крахмал или лактоза, дезинтегрирующее вещество, такое как альгиновая кислота, примогель или кукурузный крахмал; смазывающее вещество, такое как стеарат магния или стеротес; вещество, способствующее скольжению, такое как коллоидный диоксид кремния; подсластитель, такой как сахароза или сахарин; или придающее вкус средство, такое как перечная мята, метилсалицилат или средство с апельсиновым вкусом.

Для введения посредством ингаляции соединения доставляют в форме аэрозольного спрея из находящегося под давлением контейнера или дозатора, содержащего пригодный пропеллент, например газ, такой как диоксид углерода, или распылителя.

Системное введение можно осуществлять также трансмукозальными или чрескожными способами. Для трансмукозального или чрескожного введения, средства для облегчения проникновения, подходящие для барьера, подлежащего проникновению, используют в составе. Такие средства для облегчения проникновения в общем известны в данной области, и включают в себя, например, средства для трансмукозального введения, детергенты, соли желчных кислот и производные фусидовой кислоты. Трансмукозальное введение можно осуществлять с использованием назальных спреев или суппозитория. Для чрескожного введения активные соединения составляют в мази, бальзамы, гели или кремы, как общеизвестно в данной области.

Соединения можно получать также в форме суппозитория (например, с использованием общепринятых основ для суппозитория, таких как масло какао и другие глицериды) или удерживающих клизм для ректальной доставки.

В одном варианте осуществления активные соединения получают с носителями, которые могут защищать соединение против быстрого выведения из организма, например, составы с контролируемым высвобождением, включая имплантаты и микроинкапсулированные системы доставки. Можно использовать биоразлагаемые, биосовместимые полимеры, такие как этиленвинилацетат, полиангидриды, полигликолевая кислота, коллаген, полиортоэфир и полимолочная кислота. Способы получения таких составов очевидны специалисту в данной области. Эти материалы можно также получать на коммерческой основе из Alza Corporation и Nova Pharmaceuticals, Inc. Суспензии липосом (включая липосомы, нацелен-

ные на инфицированные клетки с использованием моноклональных антител против вирусных антигенов) также можно использовать в качестве фармацевтически приемлемых носителей. Их можно получать в соответствии со способами, известными специалистам в данной области, например, как описано в Патенте США № 4522811.

Является особенно преимущественным составление пероральных или парентеральных композиций в единичной дозированной форме для простоты введения и равномерности дозирования. Единичная дозированная форма, как применяют в настоящем документе, относится к физически дискретным единицам, пригодным в качестве однократных доз для субъекта, подлежащего лечению; где каждая единица содержит predetermined количество активного соединения, рассчитанное для оказания желательного терапевтического эффекта в ассоциации с необходимым фармацевтическим носителем. Определение единичных дозированных форм по этому описанию продиктовано и напрямую зависит от уникальных характеристик активного соединения и конкретного терапевтического эффекта, подлежащего достижению, и ограничений, присущих области получения соединений, таких как активное соединение для лечения индивидуумов.

Фармацевтические композиции можно заключать в контейнер, упаковку или дозатор, вместе с инструкциями для введения.

Изобретение далее описано в следующих примерах, которые не ограничивают объем изобретения, описанный в формуле изобретения.

Примеры

Пример 1. Характеризация антител против CD71

Исследования, представленные в настоящем документе, разработаны для оценки связывания антител против CD71 по этому описанию.

Моноклональное антитело M21 против CD71 по настоящему описанию получали с использованием технологии гибридомы мыши в соответствии со способами, известными в данной области. Мышей иммунизировали с использованием внеклеточного домена (ECD) CD71 человека и проводили скрининг последующих гибридом с использованием анализа цитотоксичности по типу "наездника", и для положительных по цитотоксичности клонов из этого анализа подтверждали посредством ELISA связывание с полипептидом ECD CD71 человека и подтверждали посредством FACS связывание с поверхностью клеток. Моноклональное антитело M21 против CD71 по настоящему описанию содержит вариабельную область тяжелой цепи (VH) из SEQ ID NO: 1 и вариабельную область легкой цепи (VL) из SEQ ID NO: 2, и его использовали, где описано в настоящем документе, в качестве положительного контроля.

Тестировали следующие гуманизированные антитела против CD71 на основе моноклонального антитела мыши M21 против CD71: Ab21.10 LcB:HcA (VH из SEQ ID NO: 3 и VL из SEQ ID NO: 7), Ab21.11 LcB:HcB (VH из SEQ ID NO: 4 и VL из SEQ ID NO: 7), Ab21.12 LcB:HcC (VH из SEQ ID NO: 5 и VL из SEQ ID NO: 7) и M21 (VH из SEQ ID NO: 1 и VL из SEQ ID NO: 2). Связывание различных антител против CD71 по этому описанию подтверждали посредством FACS (фиг. 1).

Как показано на фиг. 1, для всех из гуманизированных антител против CD71 показано связывание с CD71 человека, сравнимое со связыванием, показанным для антитела мыши M21 против CD71. Связывание гуманизированных антител против CD71 подтверждали на линии клеток В×PC3 посредством FACS. Кратко, клетки В×PC3 метили с использованием мышинового моноклонального антитела Mab21 или антитела против huCD71 (Ab21.10, Ab21.11 и Ab21.12) в указанных концентрациях и затем проводили детекцию с использованием меченого Alexa Fluor 647 антитела козы против IgG мыши или IgG человека с Alexa Fluor 647 соответственно.

Пример 2. Исследования маскировки

Исследования, представленные в настоящем документе, разработаны для идентификации и характеристики маскирующих групп для применения в активируемых антителах против CD71 по этому описанию.

Антитело против CD71 21.12, содержащее VH из SEQ ID NO: 5 и VL из SEQ ID NO: 7, использовали для скрининга библиотеки случайных пептидов X_{15} с общим разнообразием 6×10^{10} , где X представляет собой любую аминокислоту, с использованием способа, сходного со способом, описанным в Международной публикации PCT номер WO 2010/081173, опубликованной 15 июля 2010 г. Скрининг состоял из одного цикла сортировки MACS и пяти циклов сортировки FACS. Начальную сортировку MACS выполняли с использованием Dynabeads с белком-A (Invitrogen) и антитела против CD71 21.12 в концентрации 200 нМ. Для MACS, проводили скрининг по связыванию приблизительно 1×10^{12} клеток, и 1×10^7 клеток собирали. Антитело против CD71 21.12 конъюгировали с DyLight-488 (ThermoFisher), подтверждали активность связывания CD71, и антитело против CD71 21.12-488 использовали в качестве флуоресцентного зонда для всех циклов FACS. Бактериальные клетки окрашивали, и положительные клоны отбирали следующим образом: при 20 нМ антителе против CD71 21.12-488, 1×10^6 клеток собрано в цикле 1 FACS, при 5 нМ антителе против CD71 21.12-488, $6,2 \times 10^4$ клеток собрано в цикле 2, и при 5 нМ антителе против CD71 21.12-488, 5×10^3 клеток, и при 1 нМ антителе против CD71 21.12-488, 5×10^2 клеток собрано в цикле 3, при 1 нМ антителе против CD71 21.12-488, $> 2 \times 10^2$ клеток собрано в циклах 4 и 5.

Подтверждали, что положительная популяция из второго цикла FACS ингибировала связывание антитела против CD71 21.12-488 с рекомбинантным белком CD71. Индивидуальные клоны пептидов идентифицировали посредством анализа последовательности положительных по связыванию при 5 нМ кандидатов из цикла 3 FACS и положительных по связыванию при 1 нМ кандидатов из циклов 3, 4 и 5 FACS.

Последовательности маскирующих групп для антитела против CD71 перечислены в табл. А.

Таблица А. Маскирующие группы (ММ) для антитела против CD71

ММ	Аминокислотная последовательность	SEQ ID
TF01	QFCPWSYYLIGDCDI	16
TF02	NLCTEHSFALDCRSY	17
TF03	AEPMCTSPGCWLTLR	18
TF04	QSACIFEMTNSCTYS	19
TF05	ASQFCSTANPECNYAG	20
TF06	THRCLPMQNFCNPF	21
TF07	ICSFESWHQFSNCNP	22
TF08	RYPACYSTCNSINW	23
TF09	NRWCAPMQNYCHHST	24
TF10	AHCVMQSNHPYCNHG	25
TF11	LSHVCLITPMCNAHQ	26
TF12	AWWCAPMQNACQHYQ	27
TF13	RSPCAVPMNSCYII	28
TF14	STRCLPMQNYCHFSD	29
TF15	PNCLPMQNAQRCHSP	30
TF16	NTAFCTHNPFCNRPT	31
TF17	MYPICYSMCNIIYP	32
TF18	IMRSTSPGCYLYNT	33
TF19	TRCFPMSNNPNCMNY	34
TF20	NCGNFYTTMAMCNY	35
TF21	NPNCWAPMMNSCNAF	36
TF22	WNCENVNLYLPACMQ	37
TF23	TWCPMSNHPTCTLK	38
TF24	GYPCVPMQNRCAWKS	39
TF25	LLSPFCTQMCNPKLQ	40
TF26	MSRFCTHNPECNFTY	41
TF27	MSTCWTQMTNRCTYN	42
TF28	RKSPNCYSMCNYYFN	43
TF29	TGQCWAPMQNCTHNK	44
TF30	TKMGCSKANLNGAM	45
TF31	AHWCAPMQNRCTNAP	46
TF32	ASCPLMSNKPTCRQP	47
TF33	DQCWAPMMNPFHCNK	48
TF34	EYCEYTRPVPMGCWG	49
TF35	GMCPMSNNPNCNNY	50
TF36	GSCPLMSNRPSCHSS	51
TF37	HGDCAPMTNRCTNTT	52
TF38	KLPCWTLHQNSCTEY	53
TF39	LASCAPMQNRCYGLN	54
TF40	MDRFGCLQMCNWPKN	55
TF41	MMHCAMMQNRCSEYH	56
TF42	MRSCHSPMMNQCNHI	57
TF43	MTHCLPMQNRCTTYM	58
TF44	QSKCWTTMMNGCHIN	59
TF45	RECMPMQNNPACHMY	60
TF46	RSPACKIMCNMYQH	61
TF47	SNRCWAPMTNMCTYN	62
TF48	SRKCFPMENRCNHHT	63
TF49	TFCLPMQNSCKHTS	64
TF50	TTHCMQMKCNRPN	65
TF51	TTSCIMPMTNRCTIH	66

042024

TF52	VYSPLCHNMCNPRNT	67
TF53	WCNNRYIAPMSNCAS	68
TF54	WEYCHNTEFIGCTYK	69
TF55	WTSFCTHNIFCNMNG	70
TF56	YLRGCYEYNMCGYY	71
TF57	YSCAPMQNHPCNQOT	72
TF58	ACVNSNYPFDSNCMY	73
TF59	ADCQIFAMTNRCMNN	74
TF60	AECSPMSNRPQCHIH	75
TF61	AISCPMPQNSCYHTY	76
TF62	AKCWTEYMNHPECRI	77
TF63	ALHVLCYNFCNGPTT	78
TF64	AMCVGCSRECCWLK	79
TF65	AQPCAPMQNSCHQSV	80
TF66	ARLGCTKFNMCNFYS	81
TF67	ASCPLMSNKPQCLKH	82
TF68	ASTFCTHNPACAYIP	83
TF69	ATCPLMSNRPCISA	84
TF70	ATSMYCYSMCNTNNY	85
TF71	AYRCMPMQNSCYSTN	86
TF72	AYTGCTANMNAAY	87
TF73	CASLCKNQPCSSNRN	88
TF74	DCPMSYLLPMVNCMH	89
TF75	DCWRYLGNNMNWCYL	90
TF76	DLTFCTANPFCSREF	91
TF77	DNSFCTHNYCMLNK	92
TF78	DSRCWTGHQNRCONTI	93
TF79	EACMHSLHWRSWCKV	94
TF80	ECENLYKAPMENCLR	95
TF81	ECRLRNQPMMSNCSM	96
TF82	EHPCMPMENRCYTLN	97
TF83	ESVCMQNVCTWTT	98
TF84	EYCNMIPMTNYCSYN	99
TF85	EYLWCELMVSCSRLM	100
TF86	FKHFCTHNPECKYNT	101

042024

TF87	FPQCSPMQNKCGEGR	102
TF88	FRSQYQCQSMCNYNN	103
TF89	FRWCAPMQNYCHHST	104
TF90	FSCTAMSYAEDCWSW	105
TF91	FSQGCFHDNMCNRYQ	106
TF92	GCFQLCETCCIHSFD	107
TF93	GGHCAPMQNNCYNS	108
TF94	GKYCKMPMVNRCYIM	109
TF95	GMYCTRMQNSCAHNN	110
TF96	GPFCTHSPECQFDK	111
TF97	GQCFCSLFCRPLKP	112
TF98	GQYCNLPMVNSCNYL	113
TF99	GRSCWTSFMNRCND	114
TF100	GTCSWGSPGGQLCGR	115
TF101	GVCLLGLETYLLCFS	116
TF102	GWSYCINIYCRIDDN	117
TF103	HCANHHPTPMQNCKT	118
TF104	HCKEAPWTLYMNCNT	119
TF105	HCWWPQNIIPMNNCIS	120
TF106	HFCQNHQMVNACTA	121
TF107	HGQCMQNRCSNSY	122
TF108	HISPYCQMCNKWYN	123
TF109	HLMECSYENMCNRY	124
TF110	HMYCAPMQNACTKNT	125
TF111	HNCWTMMNKPYCSN	126
TF112	HNYCWAPMQNNCMIE	127
TF113	HPPCMQRNRCVSDH	128
TF114	HPVFCTHNPCHHNY	129
TF115	HRGCMQNSCSTKN	130
TF116	HSSCWAPHTNRCHMG	131
TF117	HSTFCTHNRNCNHS	132
TF118	HTCHYNTPMTNCHYS	133
TF119	HVSPCTMCMNSYNF	134
TF120	IAAECTKHMCNNAM	135
TF121	ICDSSAAPMTNRCMN	136

042024

TF122	INVCMPMQNRCIGQN	137
TF123	IPCHGQWNFSNCKYQ	138
TF124	IPTCVPMQNHCHYHSA	139
TF125	IVSKHCTSMCNPWNY	140
TF126	IYCPMSNNIACQNN	141
TF127	KCALSNQPLMSNCLM	142
TF128	KCHDNNFCRNMCNC	143
TF129	KCSLKHTLPMSCMA	144
TF130	KCTNAFRMPMENCMS	145
TF131	KFCQQPQTPMQNCSS	146
TF132	KGCYTWTMMNCIPK	147
TF133	KHSPYCFSMCNLQIS	148
TF134	KPRCSPMQNMCYNKQ	149
TF135	KTPCWTSMMNGCNHY	150
TF136	KYCPLMSNKPPCKPK	151
TF137	KYSPMCEFAHCNSQIK	152
TF138	LCELSASTWSELCCR	153
TF139	LCGVYEMPMTNACAA	154
TF140	LDTFCTHNFNCSKHN	155
TF141	LEKNCTYNNMNGYH	156
TF142	LESFCTHSPACVKHR	157
TF143	LGTCLPMQNGCTGSR	158
TF144	LHDCRSPAWDGCSLG	159
TF145	LHGFTHNYSCSLEK	160
TF146	LKCLAEQISLDCRST	161
TF147	LKCQQPYTLMQNCAI	162
TF148	LMCTQLPMLNGPCHT	163
TF149	LQRFCTHMLCQHNS	164
TF150	LRSPYCMGMCNFMTY	165
TF151	LSSFCTSNPFCNPYH	166
TF152	LTSPACRIMCNMDMS	167
TF153	LYNFCTHNNQCNTF	168
TF154	MHDCRMPMTNSCTYP	169
TF155	MKSPACKSMCNLYIN	170
TF156	MKYFCTHNYCNNNH	171

042024

TF157	MPCHLMPMHKNCQST	172
TF158	MPGCMPMQNGCKHYN	173
TF159	MTEFCTHNRNCMMIS	174
TF160	MTICAPMQNYCPNAN	175
TF161	MYAPTCQQMCNPVSK	176
TF162	MYCWTAMMNKPCRFN	177
TF163	MYSSYCQLMCNPVPK	178
TF164	NCTMDQILPMSNCNM	179
TF165	NCVNIHYTMMSNCNF	180
TF166	NDYCLPMQNKCNMLS	181
TF167	NFCSI PMSNHPTCNN	182
TF168	NFNCWYNPNSDCNYY	183
TF169	NPACMPMQNSCSHYD	184
TF170	NRPCWTDMMNACNHG	185
TF171	NSNFCTANYNCNWIN	186
TF172	PCHTGTYPMPMNCHT	187
TF173	PECPPMSNNPHCNKL	188
TF174	PMCWEFYMMNKCI PY	189
TF175	PSCPPMSNPACNRT	190
TF176	PSRCFVPMQNYCHNY	191
TF177	PTCREHFAMHNRCHD	192
TF178	PTHCAPMQNACTPHI	193
TF179	PTNCLPMQNRCKMNH	194
TF180	QASFC THNYNCR TNN	195
TF181	QCGFLPTDKFSNCKN	196
TF182	QNHCVTMMINGCSWT	197
TF183	QQSFC THSPACIASY	198
TF184	QSICWYMTNGCMNY	199
TF185	QSQCAPMQNSCAQKH	200
TF186	QSYCYWMTMHCNDRY	201
TF187	QWYCS PMQNGCSNDN	202
TF188	QYCAVMSNNPYCRIN	203
TF189	QYSPYCYSMCNGHKN	204
TF190	RANCSQLGWSHCNIP	205
TF191	RCGNTYYTQMANC NN	206

042024

TF192	RCPAYQHMAHVNCAN	207
TF193	RCSNLVNTPMQNCNM	208
TF194	REPCNVPMTNSCMRN	209
TF195	RGPCAVPMTNHCYSL	210
TF196	RISPGCTLMCNHYMY	211
TF197	RLCPPMSNKTACNNR	212
TF198	RMSCMPMQNSCHNTT	213
TF199	RNICLPMQNYCNNNN	214
TF200	RPCVPMQNDPTCTHI	215
TF201	RPMPCTSPGCTIGVH	216
TF202	RPSFCTHNKNCNHNH	217
TF203	RSTFCTHNPYCTQKL	218
TF204	RTATCSSFGTCSSLW	219
TF205	RTCQLMQNHPDCTMK	220
TF206	RTHCMPMQNHCMDSK	221
TF207	RTWVGCENHCYMLEK	222
TF208	RYGCVPMQNA CGGPW	223
TF209	SAQCAPMQNSCHSIK	224
TF210	SCLNAHYQPMSNCNG	225
TF211	SCTPVDDNYFNGCSK	226
TF212	SDYCFPMQNCAMWS	227
TF213	SFSEKCQNM CNP FNQ	228
TF214	SGCLPMSNNPVCNNR	229
TF215	SIGCLLPMTNGCNYK	230
TF216	SMCLPMQNNPYCNHK	231
TF217	SMFCFWHPDVCHDQE	232
TF218	SMHCSPMQNFCSNNE	233
TF219	SPPCDNMRNWCHPNM	234
TF220	SRECWAMMQNCSRNM	235
TF221	SRVCLPMQNYCKMNH	236
TF222	SSFCSMPQNF CATSI	237
TF223	SSLCMPMQNYCMNHK	238
TF224	STNACNMRNYCMWHQ	239
TF225	STNCIMPMTNGCRLN	240
TF226	STRCNFQAQMHCNYM	241

042024

TF227	STSPACNHMCNPWNG	242
TF228	SVCSRSSPGVLCRE	243
TF229	SVSPVCMCLNRYHH	244
TF230	SWTCVPMQNACMHRT	245
TF231	SYCLPMTNKPMCNDY	246
TF232	SYCPHMAMAESCNEW	247
TF233	SYSSSCTQMCNHSYY	248
TF234	TAMPCTSPGCAMEPN	249
TF235	TAMRNCDFDCNMTN	250
TF236	TASRSCFTMCNLYNH	251
TF237	TCHFPMYYQFANCIP	252
TF238	TCHSNYGPMQNSCYM	253
TF239	TCMHPNTGFYENCTI	254
TF240	TCSIDNYTSSKNC.M	255
TF241	TDNCYGSRWIKCPQT	256
TF242	TEACSPMQNKCTHIY	257
TF243	TFDCVPMQNWCSNN	258
TF244	TGRCQSPMTNGCHYK	259
TF245	THCSPMQNHPSCLHQ	260
TF246	TMQCMQMKCNKYAN	261
TF247	TNPCIMPMVNHCHPL	262
TF248	TPWCAPMQNACPKGQ	263
TF249	TQMFCTHNPECQINL	264
TF250	TRCLPMSNHPRCAMP	265
TF251	TRFCAPMQNHCMGHN	266
TF252	TRKPCHSPGQCIAMY	267
TF253	TTCPMWAPMTNCTKS	268
TF254	TTHCSPMQNGCTINR	269
TF255	TWSPYCLSMCNLRYP	270
TF256	VAFCLEPMTNKCAQV	271
TF257	VATWCTVGPACAIKG	272
TF258	VCSNTQNFPMNCNY	273
TF259	VGGCYVDDLGCARMY	274
TF260	VHLCAPMQNGCMNTQ	275
TF261	VKSPFCFSTCNMRMN	276
TF262	VSCSHGSPDGLMCRG	277
TF263	VSRECTHLNHCNRLS	278
TF264	VTCPLMSNRPACNYH	279
TF265	VTSPACQNMCMNTYNN	280
TF266	VVGCGFWDFGCQRHF	281
TF267	VVSPSCFSCNTHWV	282
TF268	VWCPRMSNNPHCASM	283
TF269	VYSPLCKSFNPIYY	284
TF270	WGKCSPMQNKCTNNS	285
TF271	WRGGCFSPGSLGLL	286
TF272	WSQCQFPMVNQCMVR	287
TF273	WTSPNCMSMCNNWIR	288
TF274	WWGCVPMNSNRCEGGR	289
TF275	YGNRCNMINSNMNY	290
TF276	YKAFCTHNYNCISKN	291
TF277	YLFPTCIEFCNSSRQ	292
TF278	YQCPMSNHPHCIVT	293
TF279	YQYCPMSNRCAIKA	294
TF280	YSAYCNYSNMCNRNS	295

Маски TF01 и TF02 укорачивали и подвергали аланиновому сканированию для получения семейств

активируемых антител с различной эффективностью маскирования:

Таблица В. Укорачивание и аланиновое сканирование маскирующих пептидов

<u>TF01 QFCPWSYYLIGDCDI</u> (SEQ ID NO: 16)	
01	TF01.01 QFCaWSYYLIGDCDI (SEQ ID NO: 297)
02	TF01.02 QFCPaSYLIGDCDI (SEQ ID NO: 298)
03	TF01.03 QFCPWaYYLIGDCDI (SEQ ID NO: 299)
04	TF01.04 QFCPWSaYLIGDCDI (SEQ ID NO: 300)
05	TF01.05 QFCPWSYaLIGDCDI (SEQ ID NO: 301)
06	TF01.06 QFCPWSYYaIGDCDI (SEQ ID NO: 302)
07	TF01.07 QFCPWSYYLaGDCDI (SEQ ID NO: 303)
08	TF01.08 QFCPWSYYLIGaCDI (SEQ ID NO: 304)
<u>TF02 NLCTEHSFALDCRSY</u> (SEQ ID NO: 17)	
09	TF02.09 NLCaEHSFALDCRSY (SEQ ID NO: 305)
10	TF02.10 NLCTaHSFALDCRSY (SEQ ID NO: 306)
11	TF02.11 NLCTEaSFALDCRSY (SEQ ID NO: 307)
12	TF02.12 NLCTEHaFALDCRSY (SEQ ID NO: 308)
13	TF02.13 NLCTEHSaALDCRSY (SEQ ID NO: 309)
14	TF02.14 NLCTEHSFAaDCRSY (SEQ ID NO: 310)
15	TF02.15 NLCTEHSFALaCRSY (SEQ ID NO: 311)
16	TF02.16 NLCTEHSFALDCaSY (SEQ ID NO: 312)
17	TF02.17 CTESHSFALDCRSY (SEQ ID NO: 313)
18	TF02.18 CTESHSFALDC (SEQ ID NO: 314)

Эти маскирующие пептиды использовали для получения активируемых антител против CD71 по этому описанию. Последовательности конкретных этих активируемых антител против CD71 показаны ниже в табл. С. В некоторых вариантах осуществления эти активируемые антитела против CD71 содержат расщепляемую группу 2001 (ISSGLLSGRSDNH; SEQ ID NO: 406), расщепляемую группу 3001 (AVGLLAPPGGLSGRSDNH; SEQ ID NO: 412), расщепляемую группу 2007 (ISSGLLSGRSDIH; SEQ ID NO: 684), расщепляемую группу 2008 (ISSGLLSGRSDQH; SEQ ID NO: 685), расщепляемую группу 2011 (ISSGLLSGRSDNP; SEQ ID NO: 688), расщепляемую группу 2012 (ISSGLLSGRSANP; SEQ ID NO: 689), расщепляемую группу 2013 (ISSGLLSGRSANI; SEQ ID NO: 690), расщепляемую группу 3007 (AVGLLAPPGGLSGRSDIH; SEQ ID NO: 692), расщепляемую группу 3008 (AVGLLAPPGGLSGRSDQH; SEQ ID NO: 693), расщепляемую группу 3011 (AVGLLAPPGGLSGRSDNP; SEQ ID NO: 696), расщепляемую группу 3012 (AVGLLAPPGGLSGRSANP; SEQ ID NO: 697) или расщепляемую группу 3013 (AVGLLAPPGGLSGRSANI; SEQ ID NO: 698), как указано.

В то время как конкретные последовательности, показанные ниже, содержат спейсерную последовательность из SEQ ID NO: 645, специалисту в данной области понятно, что активируемые антитела против CD71 по этому описанию могут содержать пригодную спейсерную последовательность, например, такую как спейсерная последовательность, выбранная из группы, состоящей из QGQSGQG (SEQ ID NO: 645), QGQSGQ (SEQ ID NO: 424), QGQSG (SEQ ID NO: 646), QGQS (SEQ ID NO: 647), QGQ (SEQ ID NO: 648), QG (SEQ ID NO: 649), QSGQ (SEQ ID NO: 666), QSGQG (SEQ ID NO: 667), SGQG (SEQ ID NO: 668), GQG (SEQ ID NO: 669), G или Q. В некоторых вариантах осуществления активируемые антитела против CD71 по этому описанию могут не обладать спейсерной последовательностью, присоединенной к N-концу.

Таблица С. Последовательности активируемых антител против CD71

HuCD71_HcC-des

Аминокислотная последовательность

QVQLVQSGAEVKKPGASVKMSCKASGYTFTSYWMHWVRQAPGQGLEWIGAIYPGNSETG
 YAQKFQGRATLTADTSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCTRENWDPGFQFVWGQGTLLITVSSASTKG
 PSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV
 TVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKHTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDT
 LMI¹SRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWL
 NGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI²SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA
 VEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV³FSCSVMHEALHNHYTQKSLS
 LSPG (SEQ ID NO: 699)

HuCD71_HcC-des

Нуклеотидная последовательность

CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGCGCCGAAGTGAAGAAACCTGGCGCCTCCGTGAAGAT
 GTCTTGAAGGCTCCGGCTACACCTTACCAGCTACTGGATGCACCTGGTGCACAGGCTCCA
 GGCCAGGCGCTCGAATGGATCGCGCCATCTACCCCGCAACTCCGAGACAGGCTACGCCAGA
 AGTTCAGGGCAGAGCCACCTGACCGCCGACACCTCCACCTCCACCGCTACATGGAAGTGT
 CAGCCTGCGGAGCGAGGACACCGCCGTGACTACTGCACCAGAGAGAACTGGGACCCCGGCTC
 GCCTTCTGGGGCCAGGGCACCCGTGATCACCCTGTCTCCGCCAGCACCAAGGGCCCTCCGTG
 TCCCTCTGGCCCTTCCAGCAAGTCCACCTCTGGCGGCACAGCTGCCCTGGGCTGCCTGGTGA
 AGACTACTTCCCCGAGCCCGTGACCGTGTCTGGAAGTCTGGCGCCTGACCAGCGGAGTGCAC
 ACCTTCCCTGCGGTGCTGCAGTCTCCGGCCTGTACTCCCTGTCTCCGTGGTGCAGTGCCT
 CCTCCAGCCTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAACCAAGCCCTCCAACACCAAGG
 GGACAAGAAGGTGGAACCCAAGTCTGCGACAAGACCCACACCTGTCTCCCTGCCCTGCCCT
 GAACTGTGGGCGGACCTCCGTGTTCTGTTCCTCCCAAGCCCAAGGACACCTGATGATGT
 CCCGGACCCCGAAGTGACCTGCGTGGTGGTGGACGTGTCCCACGAGGACCTGAAGTGAAGT
 CAATTGGTACGTGGACGGCGTGAAGTGACACAACGCCAAGACCAAGCCAGAGAGGAACAGTAC
 AACTCCACCTACCGGGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAAG
 AGTACAAGTGCAAGTGTCCAACAAGGCCCTGCCCTGCCCCATCGAAAAGACCATCTCCAAGGC
 CAAGGGCCAGCCCCGAGCCCCAGGTGTACACACTGCCACCTAGCCGGGAAGAGATGACCAAG
 AACAGGTGTCCCTGACCTGTCTGGTGAAGGCTTCTACCCCTCCGATATCGCGTGAAGTGGG
 AGAGCAACGGCCAGCCGAGAACAACTACAAGACCACCCACCTGTGCTGGACTCCGACGGCTC

ATTCTTCCTGTACTCCAAGCTGACCGTGGACAAGTCCCGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTCTCC
 TGCAGCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAGTCCCTGTCCCTGAGCCCCG
 GC (SEQ ID NO: 700)

HuCD71_HcC

Аминокислотная последовательность

QVQLVQSGAEVKKPGASVKMSCKASGYTFTSYWMHWVRQAPGQGLEWIGAIYPGNSETG
 YAQKFGGRATLTADTSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCTRENWDPGFAFWGQGLITVSSASTKG
 PSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEFVTVSWNSGALTSGVHITPPAVLQSSGLYSLSSVV
 TVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKHTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDT
 LMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWL
 NGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA
 VEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLS
 LSPGK (SEQ ID NO: 325)

HuCD71_HcC

Нуклеотидная последовательность

CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGCGCCGAAGTGAAGAAACCTGGCGCCTCCGTGAAGAT
 GTCTTGCAGGCCTCCGGCTACACCTTACCAGCTACTGGATGCACTGGGTGCGACAGGCTCCA
 GGCCAGGGCCTCGAATGGATCGGGCCATCTACCCCGCAACTCCGAGACAGGCTACGCCCAGA
 AGTTCAGGGCAGAGCCACCTGACCGCCGACACCTCCACCTCCACCGCCTACATGGAAGTGT
 CAGCCTGCGGAGCGAGGACACCGCCGTGACTACTGCACCAGAGAGAACTGGGACCCCGGCTT
 GCCTTCTGGGGCCAGGGCACCTGATCACCGTGTCTCCGCCAGCACCAAGGGCCCTCCGTGT
 TCCCTCTGGCCCTTCCAGCAAGTCCACCTCTGGCGGCACAGCTGCCCTGGGCTGCCTGGTGAA
 AGACTACTTCCCGAGCCCGTGACCGTGTCTGGAACTCTGGCGCCTGACCAGCGGAGTGCAC
 ACCTTCCCTGCGGTGCTGCAGTCTCCGGCCTGTACTCCCTGTCTCCGTGGTGACAGTGCCT
 CCTCCAGCCTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAACCACAAGCCCTCCAACACCAAGGT
 GGACAAGAAGGTGGAACCAAGTCTCGCACAAGACCCACACCTGTCTCCCTGCCCTGCCCT
 GAACTGTGGGCGGACCTTCCGTGTTTCTGTTCCTCCCAAGCCCAAGGACACCTGATGATCT
 CCCGACCCCGAAGTGACCTGCGTGGTGGTGGACGTGTCCACAGGACCTGAAGTGAAGTT
 CAATTGGTACGTGGACGGCGTGGAAAGTGACACAACGCCAAGACCAAGCCAGAGAGGAACAGTAC
 AACTCCACCTACCGGGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAAG
 AGTACAAGTGCAAGGTGTCCAACAAGGCCCTGCCTGCCCCATCGAAAAGACCATCTCCAAGGC
 CAAGGGCCAGCCCGGAGCCCGAGGTGTACACACTGCCACCTAGCCGGGAAGAGATGACCAAG
 AACCAGGTGTCCCTGACCTGTCTGGTAAAAGGCTTCTACCCCTCCGATATCGCCGTGGAATGGG
 AGAGCAACGGCCAGCCCGAGAACAAC TACAAGACCACCCACCTGTGCTGGACTCCGACGGCTC
 ATTCTTCCTGTACTCCAAGCTGACCGTGGACAAGTCCCGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTCTCC

TGCAGCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAGTCCCTGTCCCTGAGCCCCG
GCAAG (SEQ ID NO: 326)

HuCD71_LcB

Аминокислотная последовательность

DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCSASSSVYYMYWFQQKPKAPKLWIYSTSNLASGVPS
RFSGSGSGTDYTLTISSMQPEDFATYYCQRRNYPYTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFI FPPSDEQ
LKSGTASVVCLLNFPYFREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSITLTSKADYEK
HKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 323)

HuCD71_LcB

Нуклеотидная последовательность

GACATCCAGATGACCCAGTCCCATCCAGCCTGTCCGCCTCCGTGGGCGACAGAGTGAC
AATCACCTGTTCGCCAGCTCCTCCGTGTAATACATGTAATGTTCCAGCAGAAGCCCGGCAAG
GCCCCAAGCTGTGGATCTACTCCACCTCCAACCTGGCCTCCGGCGTGCCTCCAGATTCTCCG
GCTCTGGCTCCGGCACCAGTACACCCCTGACCATCTCCAGCATGCAGCCCGAGGACTTCGCCAC
CTACTACTGCCAGCAGCGCGGAACCTACCCCTACACCTTCGGCCAGGGCACCAAGCTGGAATC
AAGCGGACCGTGGCCGCTCCAGCGTGTTCATCTTCCACCCCTCCGACGAGCAGCTGAAGTCCG
GCACCGCCAGCGTGTGCTGCTGAACAACCTTACCCCGCAGGCAAGGTGCAGTGGAA
GGTGGACAACGCCCTGCAGTCCGGCAACTCCAGGAATCCGTCACCGAGCAGGACTCCAAGGAC
AGCACCTACTCCCTGTCTCCACCTGACCTGTCCAAGCCGACTACGAGAAGCACAAAGGTGT
ACGCCTGCGAAGTACCCACAGGCGCTGTCCAGCCCGTGACCAAGTCTTCAACCGCGCGCA
GTGC (SEQ ID NO: 324)

[спейсер (SEQ ID NO: 645)] [huCD71Lc_TF01_2001 (SEQ ID NO:
650)]

Аминокислотная последовательность

[QGQSGQG] [QFCPWSYLLIGDCDIGGSSGGSISSGLLSGRSDNHGGSDIQMTQSPS
SLSASVGRVTITCSASSSVYYMYWFQQKPKAPKLWIYSTSNLASGVPSRFSGSGSGTDYTLT
ISSMQPEDFATYYCQRRNYPYTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFI FPPSDEQLKSGTASVVCLLN
FPYFREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSITLTSKADYEKHKVYACEVTHQGLS
SPVTKSFNRGEC] (SEQ ID NO: 327)

[спейсер (SEQ ID NO: 662)] [huCD71Lc_TF01_2001 (SEQ ID NO:
651)]

Нуклеотидная последовательность

[CAGGGCCAGTCCGGCCAGGGA] [CAGTTCGTCCTTGGTCTACTACCTGATCGGCGA
CTGCGACATCGGCGGAGGCTCCTCCGGCGGCTCCATCTCCTTGGCCTGCTGTCCGGCAGATCC
GACAACCACGGCGGTGGCAGCGACATCCAGATGACCCAGTCCCATCCAGCCTGTCCGCCTCCG
TGGGCGACAGAGTGACAATCACCTGTTCCGCCAGTCTCCTCGTACTACATGTAATGTTCCA

GCAGAAGCCCGCAAGGCCCAAGCTGTGGATCTACTCCACCTCCAACCTGGCCTCCGGCGTG
 CCCTCCAGATTCTCCGGCTCTGGCTCCGGCACCGACTACACCCTGACCATCTCCAGCATGCAGC
 CCGAGGACTTCGCCACCTACTACTGCCAGCAGCGGGCGAACTACCCCTACACCTTCGGCCAGGG
 CACCAAGCTGGAAATCAAGCGGACCGTGGCCGCTCCAGCGTGTTCATCTTCCACCTCCGAC
 GAGCAGCTGAAGTCCGGCACCGCCAGCGTGTGTGCCTGCTGAACAACCTTACCCCGGAGG
 CCAAGGTGCAGTGAAGGTGGACAACGCCCTGCAGTCCGGCAACTCCAGGAATCCGTACCCGA
 GCAGGACTCCAAGGACAGCACCTACTCCCTGTCTCCACCTGACCCGTCCAAGGCCGACTAC
 GAGAAGCACAAAGGTGTACGCCTGCGAAGTGACCCACCAGGGCCTGTCCAGCCCGTACCAAGT
 CCTTCAACCGCGGAGTGC] (SEQ ID NO: 328)

[спейсер (SEQ ID NO: 645)] [huCD71Lc_TF01_3001 (SEQ ID NO:
 652)]

Аминокислотная последовательность

[QGQSGQG] [QFCPWSYYLIGDCDIGGSSGGSVAVLLAPPGLSGRSDNHGSDIOMT
 QSPSSLASVGDVVTITCSASSSVYYMYWFQKPKAPKLWIYSTNLASGVPSRFSGSGGTD
 YTLTISSMQPEDFATYYCQRRNYPYTFGQGTLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVC
 LLNMFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTH
 QGLSSPVTKSFNRGEC] (SEQ ID NO: 329)

[спейсер (SEQ ID NO: 662)] [huCD71Lc_TF01_3001 (SEQ ID NO:
 653)]

Нуклеотидная последовательность

[CAGGGCCAGTCCGGCCAGGGA] [CAGTCTGCCCTGGTCCCTACTACCTGATCGGCGA
 CTGCGACATCGGCGGAGGCTCCTCTGGCGGCTCTGCTGTGGGCCTGCTGGCTCCACCTGGCGGC
 CTGTCCGGCAGATCTGACAACCACGGCGGCTCCGACATCCAGATGACCCAGTCCCCCTCCAGCC
 TGTCCGCCTCCGTGGGCGACAGAGTGACAATCACCTGTTCGCCAGCTCCTCCGTGTACTACAT
 GTACTGGTTCCAGCAGAAGCCCGAAAGGCCCAAGCTGTGGATCTACTCCACCTCCAACCTG
 GCCTCCGGCGTGCCTCCAGATTCTCCGGCTCTGGCTCCGGCACCGACTACACCCTGACCATCT
 CCAGCATGCAGCCGAGGACTTCGCCACCTACTACTGCCAGCAGCGGGCGAACTACCCCTACAC
 CTTCGGCCAGGGCACCAGCTGGAAATCAAGCGGACCGTGGCCGCTCCTCCGTGTTCATCTTC
 CCACCTCCGACGAGCAGCTGAAGAGCGGCACCGCCAGCGTGGTCTGCCTGCTGAACAACCTTCT
 ACCCCCGGAGGCCAAGGTGCAGTGAAGGTGGACAACGCCCTGCAGTCCGGCAACTCCAGGA
 ATCCGTACCGAGCAGGACTCCAAGGACAGCACCTACTCCCTGTCTCCACCTGACCCGTGTC
 AAGGCCGACTACGAGAAGCACAAGGTGTACGCCTGCGAAGTGACCCACCAGGGCCTGTCCAGCC
 CCGTGACCAAGTCTTCAACCGGGGCGAGTGC] (SEQ ID NO: 330)

[спейсер (SEQ ID NO: 645)] [huCD71Lc_TF02.13_2001 (SEQ ID
 NO: 654)]

Аминокислотная последовательность

[QGQSGQG] [NLCTEHSAAALDCRSYGGGSSGGSSISSGLLSGRSDNHGGGSDIQMTQSPFS
SLSASVGDVRTITCSASSSVYYMYWFQKPKGKAPKLWIYSTSNLASGVPSRFSGSGSGTDYTLT
ISSMQPEDFATYYCQRRNYPYTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNN
FYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLTKADYEEKHKVYACEVTHQGLS
SPVTKSFNRGEC] (SEQ ID NO: 331)

[спейсер (SEQ ID NO: 663)] [huCD71Lc_TF02.13_2001 (SEQ ID
NO: 655)]

Нуклеотидная последовательность

[CAGGGACAGTCTGGCCAGGGC] [AACCTGTGCACCGAGCACTCTGCCGCTCTGGACTG
CAGATCCTACGGCGGAGGCTCCTCCGGCGGCTCCATCTCCTCTGGCCTGTGTCCGGCAGATCC
GACAACCATGGCGCGGATCCGACATCCAGATGACCCAGTCCCCCTCCAGCCTGTCCGCTCCG
TGGGCGACAGAGTGACAATCACCTGTTCGCCAGCTCCTCCGTGTACTACATGTACTGGTTCCA
GCAGAAGCCCCGGCAAGCCCCCAAGCTGTGGATCTACTCCACCAGCAACCTGGCCTCCGGCGTG
CCCTCCAGATTCTCCGGCTCTGGCTCCGGCACCAGTACACCCTGACCATCTCCAGCATGCAGC
CCGAGGACTTCGCCACCTACTACTGCCAGCAGCGGCGGAATACCCCTACACCTTCGGACAGGG
CACCAAGCTGGAATCAAGCGGACCGTGGCCGCTCCAGCGTGTTCATCTTCCACCCCTCCGAC
GAGCAGCTGAAGTCCGGCACCGCCAGCGTGGTCTGCCTGTGAACAACCTTACCCCCGCGAGG
CCAAGGTGCAGTGGAAAGGTGGACAACGCCCTGCAGTCCGGCAACTCCAGGAATCCGTCACCGA
GCAGGACTCCAAGGACAGCACCTACTCCCTGTCTCCACCTGACCCTGTCCAAGGCCGACTAC
GAGAAGCACAAAGTGTACGCTGCGAAGTGACCCACCAGGGCCTGTCCAGCCCCGTGACCAAGT
CCTTCAACCGGGCGAGTGC] (SEQ ID NO: 332)

[спейсер (SEQ ID NO: 645)] [huCD71Lc_TF02.13_3001 (SEQ ID
NO: 656)]

Аминокислотная последовательность

[QGQSGQG] [NLCTEHSAAALDCRSYGGGSSGGSSAVGLLAPPGLSGRSDNHGGGSDIQMT
QSPSSLSASVGDVRTITCSASSSVYYMYWFQKPKGKAPKLWIYSTSNLASGVPSRFSGSGSGTD
YTLTISSMQPEDFATYYCQRRNYPYTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVC
LLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLTKADYEEKHKVYACEVTH
QGLSSPVTKSFNRGEC] (SEQ ID NO: 333)

[спейсер (SEQ ID NO: 664)] [huCD71Lc_TF02.13_3001 (SEQ ID
NO: 657)]

Нуклеотидная последовательность

[CAGGGCCAGTCTGGACAGGGC] [AACCTGTGCACCGAGCACTCTGCCGCTCTGGACTG
CAGATCCTACGGCGGAGGCTCCTCTGGCGGCTCTGCTGTGGCCTGTGGCTCCACCTGGCGGC
CTGTCCGGCAGATCTGACAACCACGGCGGCTCCGACATCCAGATGACCCAGTCCCCCTCCAGCC
TGCTTGCTCCGTGGGCGACAGAGTGACAATCACCTGTTCGCCAGCTCCTCCGTGTACTACAT

GTACTGGTTCAGCAGAAGCCCGCAAGGCCCCCAAGCTGTGGATCTACTCCACCTCCAACCTG
GCCTCCGGCGTGCCTCCAGATTCTCCGGCTCTGGCTCCGGCACCGACTACACCTGACCATCT
CCAGCATGCAGCCCGAGGACTTCGCCACCTACTACTGCCAGCAGCGGGGAACTACCCCTACAC
CTTCGGACAGGGCACCAGCTGGAATCAAGCGGACCGTGGCCGCTCCCTCCGTGTTTCATCTTC
CCACCTCCGACGAGCAGTGAAGTCCGGCACCGCCAGCGTGGTCTGCTGCTGAACAACCTTCT
ACCCCGCGAGGCCAAGGTGCAGTGAAGTGGACAACGCCCTGCAGTCCGGCAACTCCAGGA
ATCCGTACCGAGCAGGACTCCAAGGACAGCCTACTCCCTGTCTCCACCTGACCTGTCC
AAGCCGACTACGAGAAGCACAAGGTGTACGCTGCGAAGTGACCCACCAGGGCTGTCCAGCC
CCGTGACCAAGTCTTCAACCGGGCGAGTGC] (SEQ ID NO: 334)

[спейсер (SEQ ID NO: 645)] [huCD71Lc_TF02.18_2001 (SEQ ID NO: 658)]

Аминокислотная последовательность

[QGQSGQG] [CTEHFALDCGGSSGGSISSGLLSGRSDNHGGGSDIQMTQSPSSLSAS
VGRDVTITCSASSVYYMYWFQKPKGKPKLWIYSTNLASGVPSPRFSGSGSDYTLTISSMQ
PEDFATYYCQRRNYPYTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNFPYPRE
AKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTK
SFNRGEC] (SEQ ID NO: 335)

[спейсер (SEQ ID NO: 665)] [huCD71Lc_TF02.18_2001 (SEQ ID NO: 659)]

Нуклеотидная последовательность

[CAGGGCCAGTCTGGCCAGGGC] [TGCACCGAGCACAGCTTCGCCCTGGACTGTGGCGG
CGGATCCTCCGGCGGCTCCATCTCCTCTGGCTGTGTCCGGCAGATCCGACAACCACGGCGGA
GGTCCGACATCCAGATGACCCAGTCCCCCTCCAGCCTGTCCGCTCCGTGGGCGACAGAGTGA
CAATCACCTGTTCCGCCAGTCTCCGTGTAATGACTGTTCCAGCAGAAGCCCGGCAA
GGCCCCAAGTGTGGATCTACTCCACCTCCAACCTGGCTCCGGCGTCCCTCCAGATCTCC
GGCTCTGGCTCCGGCACCGACTACCCCTGACCATCTCCAGCATGCAGCCCGAGGACTTCGCCA
CCTACTACTGCCAGCAGCGGGGAACTACCCCTACACCTTCGCCAGGGCACCAGCTGGAAAT
CAAGCGGACCGTGGCCGCTCCCTCCGTGTTTCATCTTCCACCTCCGACGAGCAGTGAAGTCC
GGCACCGCCAGCGTGGTGTGCTGCTGAACAACCTTACCCCGCGAGGCCAAGGTGCAGTGGGA
AGGTGGACAACGCCCTGCAGTCCGGCAACTCCAGGAATCCGTGACCGAGCAGGACTCCAAGGA
CAGCACCTACTCCCTGTCTCCACCTGACCTGTCCAAGGCCGACTACGAGAAGCACAAGGTG
TACGCTGCGAAGTGACCCACCAGGGCTGTCCAGCCCCGTGACCAAGTCTTCAACCGGGGCG
AGTGC] (SEQ ID NO: 336)

[спейсер (SEQ ID NO: 645)] [huCD71Lc_TF02.18_3001 (SEQ ID NO: 660)]

Аминокислотная последовательность

[QGQSGQG] [CTEHSFALDCGGSSGGSAVGLLAPPGLSGRSDNHGGSDIQMTQSPSS
LSASVGDVRTITCSASSSVYMYWFQKPGKAPKLWIYSTNLASGVPSRFSGSGSGTDYTLTI
SSMQPEDFATYYCQRRNYPYTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNMF
YPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSS
PVTKSFNRGEC] (SEQ ID NO: 337)

[спейсер (SEQ ID NO: 665)] [huCD71Lc_TF02.18_3001 (SEQ ID
NO: 661)]

Нуклеотидная последовательность

[CAGGGCCAGTCTGGCCAGGGC] [TGCACCGAGCACAGCTTCGCCCTGGACTGTGGCGG
CGGATCTTTCGGCGGCTCTGTGTGGCCTGTGGCTCCTCCTGGCGGCTGTCCGGCAGATCT
GACAACCACGGCGGCTCCGACATCCAGATGACCCAGTCCCCCTCCAGCCTGTCCGCCTCCGTGG
GCGACAGATGACAATCACCTGTTCCGCCAGCTCCTCCGTGTACTACATGTACTGGTTCCAGCA
GAAGCCCGCAAGGCCCAAGCTGTGGATCTACTCCACCTCCAACCTGGCCTCCGGCGTGCCC
TCCAGATTTCCGGCTCTGGCTCCGGCACCGACTACACCCTGACCATCTCCAGCATGCAGCCCG
AGGACTTCGCCACCTACTACTGCCAGCAGCGGGGAACTACCCCTACACCTTCGGCCAGGGCAC
CAAGCTGGAATCAAGCGGACCGTGGCCGCTCCCTCCGTGTTCATCTTCCCACCTCCGACGAG
CAGCTGAAGTCCGGCACCGCCAGCGTGGTGTGCCTGCTGAACAACTTACCCCCGCGAGGCCA
AGGTGCAGTGAAGGTGGACAACGCCCTGCAGTCCGGCACTCCAGGAATCCGTGACCGAGCA
GGACTCCAAGGACAGCACCTACTCCCTGTCTCCACCTGACCCTGTCCAAGGCCGACTACGAG
AAGCACAAGGTGTACGCTGCGAAGTGACCCACCAGGGCCTGTCCAGCCCCGTGACCAAGTCTT
TCAACCGGGGGCAGTGC] (SEQ ID NO: 338)

[спейсер (SEQ ID NO: 645)] [huCD71Lc_TF02.13_2012 (SEQ ID
NO: 670)]

Аминокислотная последовательность

[QGQSGQG] [NLCTEHSAAALDCRSYGGSSGGSSISSGLLSGRSANPGGGSDIQMTQSPS
SLSASVGDVRTITCSASSSVYMYWFQKPGKAPKLWIYSTNLASGVPSRFSGSGSGTDYTLTI
ISSMQPEDFATYYCQRRNYPYTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNMF
YPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSS
SPVTKSFNRGEC] (SEQ ID NO: 671)

[спейсер (SEQ ID NO: 674)] [huCD71Lc_TF02.13_2012 (SEQ ID
NO: 675)]

Нуклеотидная последовательность

[CAGGGACAGTCAGGCCAGGGC] [AATCTCTGCACGGAGCATAGCGCCGCACTTGACTG
TCGATCTTACGGCGCGGTTCTCTGGAGGCTCTATATCATCCGACTCCTCTCAGGCAGAAGC
GCTAATCTGGCGGCGGATCTGATATACAAATGACTCAGTCACCAAGCTCCCTGAGTGCGTCAG
TTGGTGATAGGGTGACGATCACTTGTAGTGGAGCTCATCTGTTTATTATATGACTGGTTTCA

ACAGAAACCCGGAAAAGCACCTAAGTTGTGGATCTACAGTACCTCCAATCTGGCTTCCGGCGTC
CCCAGCCGGTTTTCCGGCTCTGGAAGCGGAACGGATTACACGCTCACCATATCCTCTATGCAAC
CTGAAGATTTCCGAACTTACTACTGTACGCAACGCAGGAATTATCCATATACATTTGGTCAAGG
GACTAAGCTCGAAATCAAGCGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTCCCGCCATCTGAT
GAGCAGTTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGG
CCAAAGTACAGTGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGA
GCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTAC
GAGAAACASAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAGA
GCTTCAACAGGGGAGAGTGT] (SEQ ID NO: 676)

[спейсер (SEQ ID NO: 645)] [huCD71Lc_TF02.13_3011 (SEQ ID NO: 672)]

Аминокислотная последовательность

[QGQSGQG] [NLCTEHSAAALDCRSYGGSSGGSVAVGLLAPPGLSGRSDNPGGSDIQMT
QSPSSLSASVGDVITICSASSSVYMYWFQKPKGKAPKLWIYSTSNLASGVPSRFGSGSGGTD
YTLTISSMQPEDFATYYCQRRNYPYTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVC
LLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLISKADYEKHKVYACEVTH
QGLSSPVTKSFNRGEC] (SEQ ID NO: 673)

[спейсер (SEQ ID NO: 677)] [huCD71Lc_TF02.13_3011 (SEQ ID NO: 678)]

Нуклеотидная последовательность

[CAAGGGCAGTCCGGTCAAGGG] [AACTTGTGTACAGAGCATTCTGCCGCCCTTGACTG
CAGGTCTTACGGCGGAGGGAGTAGTGCCGGGAGCGCGGTGGGACTTCTGGCACCACTGGTGGG
TTGTACAGGAGGAGCGACAATCCAGGGGGTTCAGACATCCAGATGACACAAAAGTCCGAGTAGTC
TCTCAGSTAGTGTGGCGATAGAGTACAAATTACATGTAGTGCCTCCAGTAGCGTGTACTACAT
GTA CTGGTTTCAGCAGAAGCCGGGCAAAGCACCGAAACTGTGGATTTACAGTACCAGCAACCTC
GCCAGCGGTGTCCCTCTCGATTTTCAGGGAGTGGGAGTGGGACCGACTACACGCTCACCATCT
CAAGTATGCAGCCAGAAGATTTTCGCTACCTACTATTGCCAGCAGCGCGGAATATCCCTACAC
GTTCGGTCAAGGCACAAAAGTGAATCAAACGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTC
CCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCT
ATCCCAGAGAGGCCAAAAGTACAGTGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGA
GAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGC
AAAGCAGACTACGAGAAACASAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGC
CCGTACAAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGT] (SEQ ID NO: 679)

[спейсер (SEQ ID NO: 645)] [huCD71Lc_TF02.13_2011 (SEQ ID NO: 701)]

Аминокислотная последовательность

[QGQSGQG] [NLCTEHSAAALDCRSYGGGSSGGSSISSGLLSGRSDNPGGSDIQMTQSPSSLSASVGDVRTITCSASSSVYYMYWFQQKPGKAPKLWIYSTNLASGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSMQPEDFATYYCQRRNYPYTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYESTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSPVTKSFNRGEC] (SEQ ID NO: 702)

[спейсер (SEQ ID NO: 645)] [huCD71Lc_TF02.13_3012 (SEQ ID NO: 703)]

Аминокислотная последовательность

[QGQSGQG] [NLCTEHSAAALDCRSYGGGSSGGSAVGLLAPPGLSGRSANPGGSDIQMTQSPSSLSASVGDVRTITCSASSSVYYMYWFQQKPGKAPKLWIYSTNLASGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSMQPEDFATYYCQRRNYPYTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYESTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC] (SEQ ID NO: 704)

[спейсер (SEQ ID NO: 645)] [huCD71Lc_TF02.18_2011 (SEQ ID NO: 705)]

Аминокислотная последовательность

[QGQSGQG] [CTEHSFALDCGGGSSGGSSISSGLLSGRSDNPGGSDIQMTQSPSSLSASVGDVRTITCSASSSVYYMYWFQQKPGKAPKLWIYSTNLASGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSMQPEDFATYYCQRRNYPYTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYESTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC] (SEQ ID NO: 706)

[спейсер (SEQ ID NO: 645)] [huCD71Lc_TF02.18_3012 (SEQ ID NO: 707)]

Аминокислотная последовательность

[QGQSGQG] [CTEHSFALDCGGGSSGGSAVGLLAPPGLSGRSANPGGSDIQMTQSPSSLSASVGDVRTITCSASSSVYYMYWFQQKPGKAPKLWIYSTNLASGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSMQPEDFATYYCQRRNYPYTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYESTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC] (SEQ ID NO: 708)

[спейсер (SEQ ID NO: 645)] [huCD71Lc_TF02.18_2012 (SEQ ID NO: 709)]

Аминокислотная последовательность

[QGQSGQG] [CTEHSFALDCGGGSSGGSSISSGLLSGRSANPGGSDIQMTQSPSSLSASVGDVRTITCSASSSVYYMYWFQQKPGKAPKLWIYSTNLASGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSMQPEDFATYYCQRRNYPYTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPRE

AKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLKADYKHKVYACEVTHQGLSSPVTK
SFNRGEC] (SEQ ID NO: 710)

[спейсер (SEQ ID NO: 645)] [huCD71Lc_TF02.18_3011 (SEQ ID
NO: 711)]

Аминокислотная последовательность

[QGQSGQG] [CTEHSFALDCGGSSGGSAVGLLAPPGLSGRSDNPGGSDIQMTQSPSS
LSASVGDVRTITCSASSSVYYMYWFQKPKKAPKLWIYSTSNLASGVPSRFRSGSGSDTYTLTI
SSMQPEDFATYYCQRRNYPYTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNF
YPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLKADYKHKVYACEVTHQGLSS
PVTKSFNRGEC] (SEQ ID NO: 712)

[спейсер (SEQ ID NO: 645)] [huCD71Lc_TF02.13_NSUB (SEQ ID
NO: 715)]

Аминокислотная последовательность

[QGQSGQG] [NLCTEHSAAALDCRSYGGSSGGSSGGSSGGSSGGSSGGSDIQMTQSPS
SLSASVGDVRTITCSASSSVYYMYWFQKPKKAPKLWIYSTSNLASGVPSRFRSGSGSDTYTLTI
ISSMQPEDFATYYCQRRNYPYTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNN
FYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLKADYKHKVYACEVTHQGLS
SPVTKSFNRGEC] (SEQ ID NO: 716)

[спейсер (SEQ ID NO: 717)] [huCD71Lc_TF02.13_NSUB (SEQ ID
NO: 718)]

Нуклеотидная последовательность

[CAAGGCCAGTCTGGCCAGGGT] [AATTTGTGCACGGAGCATAGTCAGCTCTGGATTG
CCGGAGTTATGGAGGTGGCTCGAGCGGAGGCAGCGGAGGTTTCAGGCGGGAGCGGTGGGGGTCA
GGAGGTGGCTCTGGAGGCTCAGACATCCAGATGACCCAGTCCCCTCTTCCCTCTCTGCCAGCG
TGGGTGATCGAGTGACAATTACATGTTCCGCTCTTCTAGCGTATACTATATGTACTGGTTTCA
GCAGAAACCTGGAAAAGCCCCAACTGTGGATCTATTCTACTAGCAACCTGGCTCCGGAGTC
CCATCCCAGTCTCTGGCAGCGGTTCTGGAACCGACTACACTCTGACCATCTTCTATGCAAC
CAGAGGACTTTGCTACTTACTACTGTCAACAGAGAAGGAATATCCTTATACTTTCCGGTCAGGG
AACTAAGCTGGAATCAAGCGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCAGCATCTGAT
GAGCAGTTGAAATCTGGAACCTGCCTCTGTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGG
CCAAAGTACAGTGGAAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGCACAGA
GCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTAC
GAGAAACACAAAGTCTACGCCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCCTCACAAAGA
GCTTCAACAGGGGAGAGTGT] (SEQ ID NO: 719)

[спейсер (SEQ ID NO: 645)] [huCD71Lc_TF02.18_NSUB (SEQ ID
NO: 720)]

Аминокислотная последовательность

[QGQSGQG] [CTEHSFALDCGGSSGGSSGGSSGGSSGGSSGGSDIQMTQSPSSLSAS
 VGDRVTITCSASSSVYYMYWFQQKPGKAPKLWIYSTSNLASGVPSRFRSGSGSGTDYTLTISSMQ
 PEDFATYYCQRRNYPYTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPRE
 AKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTK
 SFNRGEC] (SEQ ID NO: 315)

[спейсер (SEQ ID NO: 645)] [huCD71Lc_TF02.13_2007 (SEQ ID
 NO: 721)]

Аминокислотная последовательность

[QGQSGQG] [NLCTEHSAAALDCRSYGGSSGGSSISSGLLSGRSDIHGGSDIQMTQSPS
 SLSASVGDRVTITCSASSSVYYMYWFQQKPGKAPKLWIYSTSNLASGVPSRFRSGSGSGTDYTLT
 ISSMQPEDFATYYCQRRNYPYTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNN
 FYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLS
 SPVTKSFNRGEC] (SEQ ID NO: 722)

[спейсер (SEQ ID NO: 645)] [huCD71Lc_TF02.13_2008 (SEQ ID
 NO: 723)]

Аминокислотная последовательность

[QGQSGQG] [NLCTEHSAAALDCRSYGGSSGGSSISSGLLSGRSDQHGGSDIQMTQSPS
 SLSASVGDRVTITCSASSSVYYMYWFQQKPGKAPKLWIYSTSNLASGVPSRFRSGSGSGTDYTLT
 ISSMQPEDFATYYCQRRNYPYTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNN
 FYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLS
 SPVTKSFNRGEC] (SEQ ID NO: 724)

[спейсер (SEQ ID NO: 645)] [huCD71Lc_TF02.13_2013 (SEQ ID
 NO: 725)]

Аминокислотная последовательность

[QGQSGQG] [NLCTEHSAAALDCRSYGGSSGGSSISSGLLSGRSANIGGGSDIQMTQSPS
 SLSASVGDRVTITCSASSSVYYMYWFQQKPGKAPKLWIYSTSNLASGVPSRFRSGSGSGTDYTLT
 ISSMQPEDFATYYCQRRNYPYTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNN
 FYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLS
 SPVTKSFNRGEC] (SEQ ID NO: 726)

[спейсер (SEQ ID NO: 645)] [huCD71Lc_TF02.13_3007 (SEQ ID
 NO: 727)]

Аминокислотная последовательность

[QGQSGQG] [NLCTEHSAAALDCRSYGGSSGGSSAVGLLAPPGLSGRSDIHGGSDIQMT
 QSPSSLSASVGDRVTITCSASSSVYYMYWFQQKPGKAPKLWIYSTSNLASGVPSRFRSGSGSGTD
 YTLTISSMQPEDFATYYCQRRNYPYTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVC

LLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYESTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTH
QGLSSPVTKSFNRGEC] (SEQ ID NO: 728)

[спейсер (SEQ ID NO: 645)] [huCD71Lc_TF02.13_3008 (SEQ ID
NO: 729)]

Аминокислотная последовательность

[QGQSGQG] [NLCTEHSAAALDCRSYGGGSSGGSAVGLLAPPGLSGRSDQHGGSDIQMT
QSPSSLSASVGDVITITCSASSSVYYMYWFQKPKGKAPKLWIYSTSNLASGVPSRFSGGSGTD
YTLTISSMQPEDFATYYCQRRNYPYTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVC
LLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYESTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTH
QGLSSPVTKSFNRGEC] (SEQ ID NO: 730)

[спейсер (SEQ ID NO: 645)] [huCD71Lc_TF02.13_3013 (SEQ ID
NO: 731)]

Аминокислотная последовательность

[QGQSGQG] [NLCTEHSAAALDCRSYGGGSSGGSAVGLLAPPGLSGRSANIGGSDIQMT
QSPSSLSASVGDVITITCSASSSVYYMYWFQKPKGKAPKLWIYSTSNLASGVPSRFSGGSGTD
YTLTISSMQPEDFATYYCQRRNYPYTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVC
LLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYESTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTH
QGLSSPVTKSFNRGEC] (SEQ ID NO: 732)

[спейсер (SEQ ID NO: 645)] [huCD71Lc_TF02.18_2007 (SEQ ID
NO: 733)]

Аминокислотная последовательность

[QGQSGQG] [CTEHSFALDCGGGSSGGSISSGLLSGRSDIHGGSDIQMTQSPSSLSAS
VGDVITITCSASSSVYYMYWFQKPKGKAPKLWIYSTSNLASGVPSRFSGGSGTDYTLTISSMQ
PEDFATYYCQRRNYPYTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPRE
AKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYESTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTK
SFNRGEC] (SEQ ID NO: 734)

[спейсер (SEQ ID NO: 645)] [huCD71Lc_TF02.18_2008 (SEQ ID
NO: 735)]

Аминокислотная последовательность

[QGQSGQG] [CTEHSFALDCGGGSSGGSISSGLLSGRSDQHGGSDIQMTQSPSSLSAS
VGDVITITCSASSSVYYMYWFQKPKGKAPKLWIYSTSNLASGVPSRFSGGSGTDYTLTISSMQ
PEDFATYYCQRRNYPYTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPRE
AKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYESTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTK
SFNRGEC] (SEQ ID NO: 736)

[спейсер (SEQ ID NO: 645)] [huCD71Lc_TF02.18_2013 (SEQ ID
NO: 737)]

Аминокислотная последовательность

[QGQSGQG] [СТЕHSFALDCGGSSGGSSISSGLLSGRSANIGGSDIQMTQSPSSLSAS
 VGDRVTITCSASSSVYMYWFQKPGKAPKLWIYSTSNLASGVPSRFRSGSGSGTDYTLTISSMQ
 PEDFATYYCQRRNYPYTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPRE
 AKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLKADYKHKVYACEVTHQGLSSPVTK

SFNRGEC] (SEQ ID NO: 738)

[спейсер (SEQ ID NO: 645)] [huCD71Lc_TF02.18_3007 (SEQ ID
 NO: 739)]

Аминокислотная последовательность

[QGQSGQG] [СТЕHSFALDCGGSSGGSAVGLLAPPGLSGRSDIHGGSDIQMTQSPSS
 LSASVGDRVTITCSASSSVYMYWFQKPGKAPKLWIYSTSNLASGVPSRFRSGSGSGTDYTLTI
 SSMQPEDFATYYCQRRNYPYTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNF
 YPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLKADYKHKVYACEVTHQGLSS
 PVTKSFNRGEC] (SEQ ID NO: 740)

[спейсер (SEQ ID NO: 645)] [huCD71Lc_TF02.18_3008 (SEQ ID
 NO: 741)]

Аминокислотная последовательность

[QGQSGQG] [СТЕHSFALDCGGSSGGSAVGLLAPPGLSGRSDQHGGSDIQMTQSPSS
 LSASVGDRVTITCSASSSVYMYWFQKPGKAPKLWIYSTSNLASGVPSRFRSGSGSGTDYTLTI
 SSMQPEDFATYYCQRRNYPYTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNF
 YPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLKADYKHKVYACEVTHQGLSS
 PVTKSFNRGEC] (SEQ ID NO: 742)

[спейсер (SEQ ID NO: 645)] [huCD71Lc_TF02.18_3013 (SEQ ID
 NO: 743)]

Аминокислотная последовательность

[QGQSGQG] [СТЕHSFALDCGGSSGGSAVGLLAPPGLSGRSANIGGSDIQMTQSPSS
 LSASVGDRVTITCSASSSVYMYWFQKPGKAPKLWIYSTSNLASGVPSRFRSGSGSGTDYTLTI
 SSMQPEDFATYYCQRRNYPYTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNF
 YPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLKADYKHKVYACEVTHQGLSS
 PVTKSFNRGEC] (SEQ ID NO: 744)

[спейсер (SEQ ID NO: 645)] [huCD71Lc_TF01_2007 (SEQ ID NO:
 745)]

Аминокислотная последовательность

[QGQSGQG] [QFCPWSYYLIGDCDIGGSSGGSSISSGLLSGRSDIHGGSDIQMTQSPS
 SLSASVGDRVTITCSASSSVYMYWFQKPGKAPKLWIYSTSNLASGVPSRFRSGSGSGTDYTLTI
 ISSMQPEDFATYYCQRRNYPYTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNN

FYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLKADYEKHKVYACEVTHQGLS
SPVTKSFNRGEC] (SEQ ID NO: 746)

[спейсер (SEQ ID NO: 645)] [huCD71Lc_TF01_3007 (SEQ ID NO:
747)]

Аминокислотная последовательность

[QGQSGQG] [QFCPWSYLLIGDCDIGGSSGGSAVGLLAPPGLSGRSDIHGGSDIOMT
QSPSSLSASVGDVRTITCSASSSVYMYWFQKPGKAPKLWIYSTSNLASGVPSRFSGSGSGTD
YTLTISSMQPEDFATYYCQRRNYPYTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVC
LLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLKADYEKHKVYACEVTH
QGLSSPVTKSFNRGEC] (SEQ ID NO: 748)

[спейсер (SEQ ID NO: 645)] [huCD71Lc_TF01_2008 (SEQ ID NO:
749)]

Аминокислотная последовательность

[QGQSGQG] [QFCPWSYLLIGDCDIGGSSGGSISSGLLSGRSDQHGGSDIOMTQSPS
SLSASVGDVRTITCSASSSVYMYWFQKPGKAPKLWIYSTSNLASGVPSRFSGSGSGTDYTLT
ISSMQPEDFATYYCQRRNYPYTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNN
FYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLKADYEKHKVYACEVTHQGLS
SPVTKSFNRGEC] (SEQ ID NO: 750)

[спейсер (SEQ ID NO: 645)] [huCD71Lc_TF01_3008 (SEQ ID NO:
751)]

Аминокислотная последовательность

[QGQSGQG] [QFCPWSYLLIGDCDIGGSSGGSAVGLLAPPGLSGRSDQHGGSDIOMT
QSPSSLSASVGDVRTITCSASSSVYMYWFQKPGKAPKLWIYSTSNLASGVPSRFSGSGSGTD
YTLTISSMQPEDFATYYCQRRNYPYTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVC
LLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLKADYEKHKVYACEVTH
QGLSSPVTKSFNRGEC] (SEQ ID NO: 752)

[спейсер (SEQ ID NO: 645)] [huCD71Lc_TF01_2011 (SEQ ID NO:
753)]

Аминокислотная последовательность

[QGQSGQG] [QFCPWSYLLIGDCDIGGSSGGSISSGLLSGRSDNPGGSDIOMTQSPS
SLSASVGDVRTITCSASSSVYMYWFQKPGKAPKLWIYSTSNLASGVPSRFSGSGSGTDYTLT
ISSMQPEDFATYYCQRRNYPYTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNN
FYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLKADYEKHKVYACEVTHQGLS
SPVTKSFNRGEC] (SEQ ID NO: 754)

[спейсер (SEQ ID NO: 645)] [huCD71Lc_TF01_3011 (SEQ ID NO:
755)]

Аминокислотная последовательность

[QGQSGQG] [QFCPWSYYLIGDCDIGGSSGGSAVGLLAPPGLSGRSDNPGGSDIQMT
 QSPSSLSASVGDVRTITCSASSSVYYMYWFQKPKGKAPKLWIYSTNLASGVPSRFSGGSGGTD
 YTLTISSMQPEDFATYYCQRRNYPYTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVC
 LLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLTKADYEKHKVYACEVTH
 QGLSSPVTKSFNRGEC] (SEQ ID NO: 756)

[спейсер (SEQ ID NO: 645)] [huCD71Lc_TF01_2012 (SEQ ID NO:
 757)]

Аминокислотная последовательность

[QGQSGQG] [QFCPWSYYLIGDCDIGGSSGGSISSGLLSGRSANPGGSDIQMTQSPS
 SLSASVGDVRTITCSASSSVYYMYWFQKPKGKAPKLWIYSTNLASGVPSRFSGGSGGTDYTLT
 ISSMQPEDFATYYCQRRNYPYTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNN
 FYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLTKADYEKHKVYACEVTHQGLS
 SPVTKSFNRGEC] (SEQ ID NO: 758)

[спейсер (SEQ ID NO: 645)] [huCD71Lc_TF01_3012 (SEQ ID NO:
 759)]

Аминокислотная последовательность

[QGQSGQG] [QFCPWSYYLIGDCDIGGSSGGSAVGLLAPPGLSGRSANPGGSDIQMT
 QSPSSLSASVGDVRTITCSASSSVYYMYWFQKPKGKAPKLWIYSTNLASGVPSRFSGGSGGTD
 YTLTISSMQPEDFATYYCQRRNYPYTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVC
 LLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLTKADYEKHKVYACEVTH
 QGLSSPVTKSFNRGEC] (SEQ ID NO: 760)

[спейсер (SEQ ID NO: 645)] [huCD71Lc_TF01_2013 (SEQ ID NO:
 761)]

Аминокислотная последовательность

[QGQSGQG] [QFCPWSYYLIGDCDIGGSSGGSISSGLLSGRSANIGGSDIQMTQSPS
 SLSASVGDVRTITCSASSSVYYMYWFQKPKGKAPKLWIYSTNLASGVPSRFSGGSGGTDYTLT
 ISSMQPEDFATYYCQRRNYPYTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNN
 FYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLTKADYEKHKVYACEVTHQGLS
 SPVTKSFNRGEC] (SEQ ID NO: 762)

[спейсер (SEQ ID NO: 645)] [huCD71Lc_TF01_3013 (SEQ ID NO:
 763)]

Аминокислотная последовательность

[QGQSGQG] [QFCPWSYYLIGDCDIGGSSGGSAVGLLAPPGLSGRSANIGGSDIQMT
 QSPSSLSASVGDVRTITCSASSSVYYMYWFQKPKGKAPKLWIYSTNLASGVPSRFSGGSGGTD
 YTLTISSMQPEDFATYYCQRRNYPYTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVC

LLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYKHKVYACEVTH
QGLSSPVTKSFNRGEC] (SEQ ID NO: 764)

[спейсер (SEQ ID NO: 645)] [huCD71Lc_TF02_2001 (SEQ ID NO:
765)]

Аминокислотная последовательность

[QGQSGQG] [NLCTEHSFALDCRSYGGSSGGSISSGLLSGRSDNHGGSDIQMTQSPS
SLSASVGDVRTITCSASSSVYYMYWFQKPGKAPKLWIYSTSNLASGVPSRFSGSGSGTDYTLT
ISSMQPEDFATYYCQRRNYPYTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNN
FYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYKHKVYACEVTHQGLS
SPVTKSFNRGEC] (SEQ ID NO: 766)

[спейсер (SEQ ID NO: 645)] [huCD71Lc_TF02_3001 (SEQ ID NO:
767)]

Аминокислотная последовательность

[QGQSGQG] [NLCTEHSFALDCRSYGGSSGGSAVGLLAPPGLLSGRSDNHGGSDIQMT
QSPSSLSASVGDVRTITCSASSSVYYMYWFQKPGKAPKLWIYSTSNLASGVPSRFSGSGSGTD
YTLTISSMQPEDFATYYCQRRNYPYTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVC
LLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYKHKVYACEVTH
QGLSSPVTKSFNRGEC] (SEQ ID NO: 768)

[спейсер (SEQ ID NO: 645)] [huCD71Lc_TF02_2007 (SEQ ID NO:
769)]

Аминокислотная последовательность

[QGQSGQG] [NLCTEHSFALDCRSYGGSSGGSISSGLLSGRSDIHGGSDIQMTQSPS
SLSASVGDVRTITCSASSSVYYMYWFQKPGKAPKLWIYSTSNLASGVPSRFSGSGSGTDYTLT
ISSMQPEDFATYYCQRRNYPYTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNN
FYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYKHKVYACEVTHQGLS
SPVTKSFNRGEC] (SEQ ID NO: 770)

[спейсер (SEQ ID NO: 645)] [huCD71Lc_TF02_3007 (SEQ ID NO:
771)]

Аминокислотная последовательность

[QGQSGQG] [NLCTEHSFALDCRSYGGSSGGSAVGLLAPPGLLSGRSDIHGGSDIQMT
QSPSSLSASVGDVRTITCSASSSVYYMYWFQKPGKAPKLWIYSTSNLASGVPSRFSGSGSGTD
YTLTISSMQPEDFATYYCQRRNYPYTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVC
LLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYKHKVYACEVTH
QGLSSPVTKSFNRGEC] (SEQ ID NO: 772)

[спейсер (SEQ ID NO: 645)] [huCD71Lc_TF02_2008 (SEQ ID NO:
773)]

Аминокислотная последовательность

[QGQSGQG] [NLCTEHSFALDCRSYGGGSSGGSSISSGLLSGRSDQHGGGSDIQMTQSPS
SLSASVGDVRTITCSASSSVYYMYWFQQKPGKAPKLWIYSTSNLASGVPSRFRSGSGSGTDYTLT
ISSMQPEDFATYYCQQRNYPYTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNN
FYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLS
SPVTKSFNRGEC] (SEQ ID NO: 774)

[спейсер (SEQ ID NO: 645)] [huCD71Lc_TF02_3008 (SEQ ID NO:
775)]

Аминокислотная последовательность

[QGQSGQG] [NLCTEHSFALDCRSYGGGSSGGSAVGLLAPPGGLSGRSDQHGGGSDIQMT
QSPSSLSASVGDVRTITCSASSSVYYMYWFQQKPGKAPKLWIYSTSNLASGVPSRFRSGSGSGTD
YTLTISMQPEDFATYYCQQRNYPYTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVC
LLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTH
QGLSSPVTKSFNRGEC] (SEQ ID NO: 776)

[спейсер (SEQ ID NO: 645)] [huCD71Lc_TF02_2011 (SEQ ID NO:
777)]

Аминокислотная последовательность

[QGQSGQG] [NLCTEHSFALDCRSYGGGSSGGSSISSGLLSGRSDNPGGGSDIQMTQSPS
SLSASVGDVRTITCSASSSVYYMYWFQQKPGKAPKLWIYSTSNLASGVPSRFRSGSGSGTDYTLT
ISSMQPEDFATYYCQQRNYPYTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNN
FYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLS
SPVTKSFNRGEC] (SEQ ID NO: 778)

[спейсер (SEQ ID NO: 645)] [huCD71Lc_TF02_3011 (SEQ ID NO:
779)]

Аминокислотная последовательность

[QGQSGQG] [NLCTEHSFALDCRSYGGGSSGGSAVGLLAPPGGLSGRSDNPGGGSDIQMT
QSPSSLSASVGDVRTITCSASSSVYYMYWFQQKPGKAPKLWIYSTSNLASGVPSRFRSGSGSGTD
YTLTISMQPEDFATYYCQQRNYPYTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVC
LLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTH
QGLSSPVTKSFNRGEC] (SEQ ID NO: 780)

[спейсер (SEQ ID NO: 645)] [huCD71Lc_TF02_2012 (SEQ ID NO:
781)]

Аминокислотная последовательность

[QGQSGQG] [NLCTEHSFALDCRSYGGGSSGGSSISSGLLSGRSANPGGGSDIQMTQSPS
SLSASVGDVRTITCSASSSVYYMYWFQQKPGKAPKLWIYSTSNLASGVPSRFRSGSGSGTDYTLT
ISSMQPEDFATYYCQQRNYPYTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNN

FYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYESTYLSSTLTLSKADYKHKVYACEVTHQGLS
SPVTKSFNRGEC] (SEQ ID NO: 782)

[спейсер (SEQ ID NO: 645)] [huCD71Lc_TF02_3012 (SEQ ID NO:
783)]

Аминокислотная последовательность

[QGQSGQG] [NLCTEHSFALDCRSYGGSSGGSAVGLLAPPGLSGRSANPGGSDIQMT
QSPSSLSASVGDRVTITCSASSSVYMYWFQKPKGKAPKLWIYSTSNLASGVPSRFSGGSGTD
YTLTISSMQPEDFATYYCQRRNYPYTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVC
LLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYESTYLSSTLTLSKADYKHKVYACEVTH
QGLSSPVTKSFNRGEC] (SEQ ID NO: 784)

[спейсер (SEQ ID NO: 645)] [huCD71Lc_TF02_2013 (SEQ ID NO:
785)]

Аминокислотная последовательность

[QGQSGQG] [NLCTEHSFALDCRSYGGSSGGSISSGLLSGRSANIGGSDIQMTQSPS
SLSASVGDRVTITCSASSSVYMYWFQKPKGKAPKLWIYSTSNLASGVPSRFSGGSGTDYTLT
ISSMQPEDFATYYCQRRNYPYTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVC
LLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYESTYLSSTLTLSKADYKHKVYACEVTHQGLS
SPVTKSFNRGEC] (SEQ ID NO: 786)

[спейсер (SEQ ID NO: 645)] [huCD71Lc_TF02_3013 (SEQ ID NO:
787)]

Аминокислотная последовательность

[QGQSGQG] [NLCTEHSFALDCRSYGGSSGGSAVGLLAPPGLSGRSANIGGSDIQMT
QSPSSLSASVGDRVTITCSASSSVYMYWFQKPKGKAPKLWIYSTSNLASGVPSRFSGGSGTD
YTLTISSMQPEDFATYYCQRRNYPYTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVC
LLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYESTYLSSTLTLSKADYKHKVYACEVTH
QGLSSPVTKSFNRGEC] (SEQ ID NO: 788)

[спейсер (SEQ ID NO: 645)] [huCD71Lc_TF01_2001 домен VL
(SEQ ID NO: 809)]

Аминокислотная последовательность

[QGQSGQG] [QFCPWSYYLIGDCDIGGSSGGSISSGLLSGRSDNHGGSDIQMTQSPS
SLSASVGDRVTITCSASSSVYMYWFQKPKGKAPKLWIYSTSNLASGVPSRFSGGSGTDYTLT
ISSMQPEDFATYYCQRRNYPYTFGQGTKLEIK] (SEQ ID NO: 810)

[спейсер (SEQ ID NO: 645)] [huCD71Lc_TF01_3001 домен VL
(SEQ ID NO: 811)]

Аминокислотная последовательность

[QGQSGQG][QFCPWSYLLIGDCDIGGSSGGSAVGLLAPPGLSGRSDNHGGSDIQMT
QSPSSLSASVGDVRTITCSASSSVYYMYWFQKPKGKAPKLWIYSTSNLASGVPSRFSGSGSGTD
YTLTISSMQPEDFATYYCQRRNYPYTFGQGTKLEIK] (SEQ ID NO: 812)

[спейсер (SEQ ID NO: 645)] [huCD71Lc_TF02.13_2001 домен VL
(SEQ ID NO: 813)]

Аминокислотная последовательность

[QGQSGQG][NLCTEHSAAALDCRSYGGSSGGSISSGLLSGRSDNHGGSDIQMTQSPS
SLSASVGDVRTITCSASSSVYYMYWFQKPKGKAPKLWIYSTSNLASGVPSRFSGSGSGTDYTLT
ISSMQPEDFATYYCQRRNYPYTFGQGTKLEIK] (SEQ ID NO: 814)

[спейсер (SEQ ID NO: 645)] [huCD71Lc_TF02.13_3001 домен VL
(SEQ ID NO: 815)]

Аминокислотная последовательность

[QGQSGQG][NLCTEHSAAALDCRSYGGSSGGSAVGLLAPPGLSGRSDNHGGSDIQMT
QSPSSLSASVGDVRTITCSASSSVYYMYWFQKPKGKAPKLWIYSTSNLASGVPSRFSGSGSGTD
YTLTISSMQPEDFATYYCQRRNYPYTFGQGTKLEIK] (SEQ ID NO: 816)

[спейсер (SEQ ID NO: 645)] [huCD71Lc_TF02.18_2001 домен VL
(SEQ ID NO: 817)]

Аминокислотная последовательность

[QGQSGQG][CTEHSFALDCGGSSGGSISSGLLSGRSDNHGGSDIQMTQSPSSLSAS
VGDVRTITCSASSSVYYMYWFQKPKGKAPKLWIYSTSNLASGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSMQ
PEDFATYYCQRRNYPYTFGQGTKLEIK] (SEQ ID NO: 818)

[спейсер (SEQ ID NO: 645)] [huCD71Lc_TF02.18_3001 домен VL
(SEQ ID NO: 819)]

Аминокислотная последовательность

[QGQSGQG][CTEHSFALDCGGSSGGSAVGLLAPPGLSGRSDNHGGSDIQMTQSPSS
LSASVGDVRTITCSASSSVYYMYWFQKPKGKAPKLWIYSTSNLASGVPSRFSGSGSGTDYTLTI
SSMQPEDFATYYCQRRNYPYTFGQGTKLEIK] (SEQ ID NO: 820)

[спейсер (SEQ ID NO: 645)] [huCD71Lc_TF02.13_2012 домен VL
(SEQ ID NO: 821)]

Аминокислотная последовательность

[QGQSGQG][NLCTEHSAAALDCRSYGGSSGGSISSGLLSGRSANPGGGSDIQMTQSPS
SLSASVGDVRTITCSASSSVYYMYWFQKPKGKAPKLWIYSTSNLASGVPSRFSGSGSGTDYTLT
ISSMQPEDFATYYCQRRNYPYTFGQGTKLEIK] (SEQ ID NO: 822)

[спейсер (SEQ ID NO: 645)] [huCD71Lc_TF02.13_3011 домен VL
(SEQ ID NO: 823)]

Аминокислотная последовательность

[QGQSGQG] [NLCTEHSAAALDCRSYGGSSGGSAVGLLAPPGGLSGRSDNPGGSDIQMT
QSPSSLSASVGDVRTITCSASSSVYYMYWFQQKPGKAPKLWIYSTSNLASGVPSRFRSGSGSGTD
YTLTISSMQPEDFATYYCQRRNYPYTFGQGTKLEIK] (SEQ ID NO: 824)

[спейсер (SEQ ID NO: 645)] [huCD71Lc_TF02.13_2011 домен VL
(SEQ ID NO: 825)]

Аминокислотная последовательность

[QGQSGQG] [NLCTEHSAAALDCRSYGGSSGGSISSGLLSGRSDNPGGSDIQMTQSPS
SLSASVGDVRTITCSASSSVYYMYWFQQKPGKAPKLWIYSTSNLASGVPSRFRSGSGSGTDYTLT
ISSMQPEDFATYYCQRRNYPYTFGQGTKLEIK] (SEQ ID NO: 826)

[спейсер (SEQ ID NO: 645)] [huCD71Lc_TF02.13_3012 домен VL
(SEQ ID NO: 827)]

Аминокислотная последовательность

[QGQSGQG] [NLCTEHSAAALDCRSYGGSSGGSAVGLLAPPGGLSGRSANPGGSDIQMT
QSPSSLSASVGDVRTITCSASSSVYYMYWFQQKPGKAPKLWIYSTSNLASGVPSRFRSGSGSGTD
YTLTISSMQPEDFATYYCQRRNYPYTFGQGTKLEIK] (SEQ ID NO: 828)

[спейсер (SEQ ID NO: 645)] [huCD71Lc_TF02.18_2011 домен VL
(SEQ ID NO: 829)]

Аминокислотная последовательность

[QGQSGQG] [CTEHSFALDCGGSSGGSISSGLLSGRSDNPGGSDIQMTQSPSSLSAS
VGDVRTITCSASSSVYYMYWFQQKPGKAPKLWIYSTSNLASGVPSRFRSGSGSGTDYTLTISSMQ
PEDFATYYCQRRNYPYTFGQGTKLEIK] (SEQ ID NO: 830)

[спейсер (SEQ ID NO: 645)] [huCD71Lc_TF02.18_3012 домен VL
(SEQ ID NO: 831)]

Аминокислотная последовательность

[QGQSGQG] [CTEHSFALDCGGSSGGSAVGLLAPPGGLSGRSANPGGSDIQMTQSPSS
LSASVGDVRTITCSASSSVYYMYWFQQKPGKAPKLWIYSTSNLASGVPSRFRSGSGSGTDYTLTI
SSMQPEDFATYYCQRRNYPYTFGQGTKLEIK] (SEQ ID NO: 832)

[спейсер (SEQ ID NO: 645)] [huCD71Lc_TF02.18_2012 домен VL
(SEQ ID NO: 833)]

Аминокислотная последовательность

[QGQSGQG] [CTEHSFALDCGGSSGGSISSGLLSGRSANPGGSDIQMTQSPSSLSAS
VGDVRTITCSASSSVYYMYWFQQKPGKAPKLWIYSTSNLASGVPSRFRSGSGSGTDYTLTISSMQ
PEDFATYYCQRRNYPYTFGQGTKLEIK] (SEQ ID NO: 834)

[спейсер (SEQ ID NO: 645)] [huCD71Lc_TF02.18_3011 домен VL
(SEQ ID NO: 835)]

Аминокислотная последовательность

[QGQSGQG] [СТЕHSFALDCGGSSGGSAVGLLAPPGLSGRSDNPGGSDIQMTQSPSS
LSASVGDVRTITCSASSSVYYMYWFQKPKGKAPKLWIYSTSNLASGVPSRFRSGSGSGTDYTLTI
SSMQPEDFATYYCQRRNYPYTFGQGTKLEIK] (SEQ ID NO: 836)
[спейсер (SEQ ID NO: 645)] [huCD71Lc_TF02.13_NSUB домен VL
(SEQ ID NO: 837)]
Аминокислотная последовательность
[QGQSGQG] [NLCTEHSAAALDCRSYGGSSGGSSGGSSGGSSGGSSGGSDIQMTQSPS
SLSASVGDVRTITCSASSSVYYMYWFQKPKGKAPKLWIYSTSNLASGVPSRFRSGSGSGTDYTLTI
ISSMQPEDFATYYCQRRNYPYTFGQGTKLEIK] (SEQ ID NO: 838)
[спейсер (SEQ ID NO: 645)] [huCD71Lc_TF02.18_NSUB домен VL
(SEQ ID NO: 839)]
Аминокислотная последовательность
[QGQSGQG] [СТЕHSFALDCGGSSGGSSGGSSGGSSGGSSGGSDIQMTQSPSSLAS
VGDVRTITCSASSSVYYMYWFQKPKGKAPKLWIYSTSNLASGVPSRFRSGSGSGTDYTLTISSMQ
PEDFATYYCQRRNYPYTFGQGTKLEIK] (SEQ ID NO: 840)
[спейсер (SEQ ID NO: 645)] [huCD71Lc_TF02.13_2007 домен VL
(SEQ ID NO: 841)]
Аминокислотная последовательность
[QGQSGQG] [NLCTEHSAAALDCRSYGGSSGGSSISSGLLSGRSDIHGGGSDIQMTQSPS
SLSASVGDVRTITCSASSSVYYMYWFQKPKGKAPKLWIYSTSNLASGVPSRFRSGSGSGTDYTLTI
ISSMQPEDFATYYCQRRNYPYTFGQGTKLEIK] (SEQ ID NO: 842)
[спейсер (SEQ ID NO: 645)] [huCD71Lc_TF02.13_2008 домен VL
(SEQ ID NO: 843)]
Аминокислотная последовательность
[QGQSGQG] [NLCTEHSAAALDCRSYGGSSGGSSISSGLLSGRSDQHGGGSDIQMTQSPS
SLSASVGDVRTITCSASSSVYYMYWFQKPKGKAPKLWIYSTSNLASGVPSRFRSGSGSGTDYTLTI
ISSMQPEDFATYYCQRRNYPYTFGQGTKLEIK] (SEQ ID NO: 844)
[спейсер (SEQ ID NO: 645)] [huCD71Lc_TF02.13_2013 домен VL
(SEQ ID NO: 845)]
Аминокислотная последовательность
[QGQSGQG] [NLCTEHSAAALDCRSYGGSSGGSSISSGLLSGRSANIGGGSDIQMTQSPS
SLSASVGDVRTITCSASSSVYYMYWFQKPKGKAPKLWIYSTSNLASGVPSRFRSGSGSGTDYTLTI
ISSMQPEDFATYYCQRRNYPYTFGQGTKLEIK] (SEQ ID NO: 846)
[спейсер (SEQ ID NO: 645)] [huCD71Lc_TF02.13_3007 домен VL
(SEQ ID NO: 847)]
Аминокислотная последовательность

[QGQSGQG] [NLCTEHSAAALDCRSYGGSSGGSAVGLLAPPGLSGRSDIHGGSDIQMT
QSPSSLSASVGDVRTITCSASSSVYYMYWFQQKPGKAPKLWIYSTSNLASGVPSRFSGSGSGTD
YTLTISSMQPEDFATYYCQRRNYPYTFGQGTKLEIK] (SEQ ID NO: 848)

[спейсер (SEQ ID NO: 645)] [huCD71Lc_TF02.13_3008 домен VL
(SEQ ID NO: 849)]

Аминокислотная последовательность

[QGQSGQG] [NLCTEHSAAALDCRSYGGSSGGSAVGLLAPPGLSGRSDIHGGSDIQMT
QSPSSLSASVGDVRTITCSASSSVYYMYWFQQKPGKAPKLWIYSTSNLASGVPSRFSGSGSGTD
YTLTISSMQPEDFATYYCQRRNYPYTFGQGTKLEIK] (SEQ ID NO: 850)

[спейсер (SEQ ID NO: 645)] [huCD71Lc_TF02.13_3013 домен VL
(SEQ ID NO: 851)]

Аминокислотная последовательность

[QGQSGQG] [NLCTEHSAAALDCRSYGGSSGGSAVGLLAPPGLSGRSANIGGSDIQMT
QSPSSLSASVGDVRTITCSASSSVYYMYWFQQKPGKAPKLWIYSTSNLASGVPSRFSGSGSGTD
YTLTISSMQPEDFATYYCQRRNYPYTFGQGTKLEIK] (SEQ ID NO: 852)

[спейсер (SEQ ID NO: 645)] [huCD71Lc_TF02.18_2007 домен VL
(SEQ ID NO: 853)]

Аминокислотная последовательность

[QGQSGQG] [CTEHSFALDCGGSSGGSSISSGLLSGRSDIHGGSDIQMTQSPSSLSAS
VGDVRTITCSASSSVYYMYWFQQKPGKAPKLWIYSTSNLASGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSMQ
PEDFATYYCQRRNYPYTFGQGTKLEIK] (SEQ ID NO: 854)

[спейсер (SEQ ID NO: 645)] [huCD71Lc_TF02.18_2008 домен VL
(SEQ ID NO: 855)]

Аминокислотная последовательность

[QGQSGQG] [CTEHSFALDCGGSSGGSSISSGLLSGRSDQHGGSDIQMTQSPSSLSAS
VGDVRTITCSASSSVYYMYWFQQKPGKAPKLWIYSTSNLASGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSMQ
PEDFATYYCQRRNYPYTFGQGTKLEIK] (SEQ ID NO: 856)

[спейсер (SEQ ID NO: 645)] [huCD71Lc_TF02.18_2013 домен VL
(SEQ ID NO: 857)]

Аминокислотная последовательность

[QGQSGQG] [CTEHSFALDCGGSSGGSSISSGLLSGRSANIGGSDIQMTQSPSSLSAS
VGDVRTITCSASSSVYYMYWFQQKPGKAPKLWIYSTSNLASGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSMQ
PEDFATYYCQRRNYPYTFGQGTKLEIK] (SEQ ID NO: 858)

[спейсер (SEQ ID NO: 645)] [huCD71Lc_TF02.18_3007 домен VL
(SEQ ID NO: 859)]

Аминокислотная последовательность

[QGQSGQG] [СТЕHSFALDCGGSSGGSAVGLLAPPGLSGRSDIHGGSDIQMTQSPSS
LSASVGDRVTITCSASSSVYYMYWFQQKPGKAPKLWIYSTSNLASGVPSRFRSGSGSGTDYTLTI
SSMQPEDFATYYCQRRNYPYTFGQGTKLEIK] (SEQ ID NO: 860)

[спейсер (SEQ ID NO: 645)] [huCD71Lc_TF02.18_3008 домен VL
(SEQ ID NO: 861)]

Аминокислотная последовательность

[QGQSGQG] [СТЕHSFALDCGGSSGGSAVGLLAPPGLSGRSDQHGGSDIQMTQSPSS
LSASVGDRVTITCSASSSVYYMYWFQQKPGKAPKLWIYSTSNLASGVPSRFRSGSGSGTDYTLTI
SSMQPEDFATYYCQRRNYPYTFGQGTKLEIK] (SEQ ID NO: 862)

[спейсер (SEQ ID NO: 645)] [huCD71Lc_TF02.18_3013 домен VL
(SEQ ID NO: 863)]

Аминокислотная последовательность

[QGQSGQG] [СТЕHSFALDCGGSSGGSAVGLLAPPGLSGRSANIGGSDIQMTQSPSS
LSASVGDRVTITCSASSSVYYMYWFQQKPGKAPKLWIYSTSNLASGVPSRFRSGSGSGTDYTLTI
SSMQPEDFATYYCQRRNYPYTFGQGTKLEIK] (SEQ ID NO: 864)

[спейсер (SEQ ID NO: 645)] [huCD71Lc_TF01_2007 домен VL
(SEQ ID NO: 865)]

Аминокислотная последовательность

[QGQSGQG] [QFCPWSYYLIGDCDIGGGSSGSISSGLLSGRSDIHGGSDIQMTQSPSS
SLSASVGDRVTITCSASSSVYYMYWFQQKPGKAPKLWIYSTSNLASGVPSRFRSGSGSGTDYTLTI
ISSMQPEDFATYYCQRRNYPYTFGQGTKLEIK] (SEQ ID NO: 866)

[спейсер (SEQ ID NO: 645)] [huCD71Lc_TF01_3007 домен VL
(SEQ ID NO: 867)]

Аминокислотная последовательность

[QGQSGQG] [QFCPWSYYLIGDCDIGGGSSGGSAVGLLAPPGLSGRSDIHGGSDIQMT
QSPSSLSASVGDRVTITCSASSSVYYMYWFQQKPGKAPKLWIYSTSNLASGVPSRFRSGSGSGTD
YTLTISSMQPEDFATYYCQRRNYPYTFGQGTKLEIK] (SEQ ID NO: 868)

[спейсер (SEQ ID NO: 645)] [huCD71Lc_TF01_2008 домен VL
(SEQ ID NO: 869)]

Аминокислотная последовательность

[QGQSGQG] [QFCPWSYYLIGDCDIGGGSSGSISSGLLSGRSDQHGGSDIQMTQSPSS
SLSASVGDRVTITCSASSSVYYMYWFQQKPGKAPKLWIYSTSNLASGVPSRFRSGSGSGTDYTLTI
ISSMQPEDFATYYCQRRNYPYTFGQGTKLEIK] (SEQ ID NO: 870)

[спейсер (SEQ ID NO: 645)] [huCD71Lc_TF01_3008 домен VL
(SEQ ID NO: 871)]

Аминокислотная последовательность

[QGQSGQG][QFCPWSYYLIGDCDIGGSSGGSAVGLLAPPGLSGRSDQHGGSDIQMT
QSPSSLASVGDVRTITCSASSSVYMYWFQKPKGKAPKLWIYSTSNLASGVPSRFSGSGSGTD
YTLTISSMQPEDFATYYCQRRNYPYTFGQGTKLEIK] (SEQ ID NO: 872)

[спейсер (SEQ ID NO: 645)] [huCD71Lc_TF01_2011 домен VL
(SEQ ID NO: 873)]

Аминокислотная последовательность

[QGQSGQG][QFCPWSYYLIGDCDIGGSSGGSISSGLLSGRSDNPGGSDIQMTQSPS
SLSASVGDVRTITCSASSSVYMYWFQKPKGKAPKLWIYSTSNLASGVPSRFSGSGSGTDYTLT
ISSMQPEDFATYYCQRRNYPYTFGQGTKLEIK] (SEQ ID NO: 874)

[спейсер (SEQ ID NO: 645)] [huCD71Lc_TF01_3011 домен VL
(SEQ ID NO: 875)]

Аминокислотная последовательность

[QGQSGQG][QFCPWSYYLIGDCDIGGSSGGSAVGLLAPPGLSGRSDNPGGSDIQMT
QSPSSLASVGDVRTITCSASSSVYMYWFQKPKGKAPKLWIYSTSNLASGVPSRFSGSGSGTD
YTLTISSMQPEDFATYYCQRRNYPYTFGQGTKLEIK] (SEQ ID NO: 876)

[спейсер (SEQ ID NO: 645)] [huCD71Lc_TF01_2012 домен VL
(SEQ ID NO: 877)]

Аминокислотная последовательность

[QGQSGQG][QFCPWSYYLIGDCDIGGSSGGSISSGLLSGRSANPGGSDIQMTQSPS
SLSASVGDVRTITCSASSSVYMYWFQKPKGKAPKLWIYSTSNLASGVPSRFSGSGSGTDYTLT
ISSMQPEDFATYYCQRRNYPYTFGQGTKLEIK] (SEQ ID NO: 878)

[спейсер (SEQ ID NO: 645)] [huCD71Lc_TF01_3012 домен VL
(SEQ ID NO: 879)]

Аминокислотная последовательность

[QGQSGQG][QFCPWSYYLIGDCDIGGSSGGSAVGLLAPPGLSGRSANPGGSDIQMT
QSPSSLASVGDVRTITCSASSSVYMYWFQKPKGKAPKLWIYSTSNLASGVPSRFSGSGSGTD
YTLTISSMQPEDFATYYCQRRNYPYTFGQGTKLEIK] (SEQ ID NO: 880)

[спейсер (SEQ ID NO: 645)] [huCD71Lc_TF01_2013 домен VL
(SEQ ID NO: 881)]

Аминокислотная последовательность

[QGQSGQG][QFCPWSYYLIGDCDIGGSSGGSISSGLLSGRSANIGGSDIQMTQSPS
SLSASVGDVRTITCSASSSVYMYWFQKPKGKAPKLWIYSTSNLASGVPSRFSGSGSGTDYTLT
ISSMQPEDFATYYCQRRNYPYTFGQGTKLEIK] (SEQ ID NO: 882)

[спейсер (SEQ ID NO: 645)] [huCD71Lc_TF01_3013 домен VL
(SEQ ID NO: 883)]

Аминокислотная последовательность

[QGQSGQG][QFCPWSYYLIGDCDIGGSSGGSAVGLLAPPGGLSGRSANIGGSDIQMT
QSPSSLSASVGRVTTITCSASSSVYYMYWFQQKPGKAPKLWIYSTSNLASGVPSRFSGSGSGTD
YTLLTISSMQPEDFATYYCQRRNYPYTFGQGTKLEIK] (SEQ ID NO: 884)
[спейсер (SEQ ID NO: 645)] [huCD71Lc_TF02_2001 домен VL
(SEQ ID NO: 885)]
Аминокислотная последовательность
[QGQSGQG][NLCTEHSFALDCRSYGGGSSGGSISSGLLSGRSDNHGGGSDIQMTQSPS
SLSASVGRVTTITCSASSSVYYMYWFQQKPGKAPKLWIYSTSNLASGVPSRFSGSGSGTDYTLT
ISSMQPEDFATYYCQRRNYPYTFGQGTKLEIK] (SEQ ID NO: 886)
[спейсер (SEQ ID NO: 645)] [huCD71Lc_TF02_3001 домен VL
(SEQ ID NO: 887)]
Аминокислотная последовательность
[QGQSGQG][NLCTEHSFALDCRSYGGGSSGGSAVGLLAPPGGLSGRSDNHGGSDIQMT
QSPSSLSASVGRVTTITCSASSSVYYMYWFQQKPGKAPKLWIYSTSNLASGVPSRFSGSGSGTD
YTLLTISSMQPEDFATYYCQRRNYPYTFGQGTKLEIK] (SEQ ID NO: 888)
[спейсер (SEQ ID NO: 645)] [huCD71Lc_TF02_2007 домен VL
(SEQ ID NO: 889)]
Аминокислотная последовательность
[QGQSGQG][NLCTEHSFALDCRSYGGGSSGGSISSGLLSGRSDIHGGGSDIQMTQSPS
SLSASVGRVTTITCSASSSVYYMYWFQQKPGKAPKLWIYSTSNLASGVPSRFSGSGSGTDYTLT
ISSMQPEDFATYYCQRRNYPYTFGQGTKLEIK] (SEQ ID NO: 890)
[спейсер (SEQ ID NO: 645)] [huCD71Lc_TF02_3007 домен VL
(SEQ ID NO: 891)]
Аминокислотная последовательность
[QGQSGQG][NLCTEHSFALDCRSYGGGSSGGSAVGLLAPPGGLSGRSDIHGGSDIQMT
QSPSSLSASVGRVTTITCSASSSVYYMYWFQQKPGKAPKLWIYSTSNLASGVPSRFSGSGSGTD
YTLLTISSMQPEDFATYYCQRRNYPYTFGQGTKLEIK] (SEQ ID NO: 892)
[спейсер (SEQ ID NO: 645)] [huCD71Lc_TF02_2008 домен VL
(SEQ ID NO: 893)]
Аминокислотная последовательность
[QGQSGQG][NLCTEHSFALDCRSYGGGSSGGSISSGLLSGRSDQHGGGSDIQMTQSPS
SLSASVGRVTTITCSASSSVYYMYWFQQKPGKAPKLWIYSTSNLASGVPSRFSGSGSGTDYTLT
ISSMQPEDFATYYCQRRNYPYTFGQGTKLEIK] (SEQ ID NO: 894)
[спейсер (SEQ ID NO: 645)] [huCD71Lc_TF02_3008 домен VL
(SEQ ID NO: 895)]
Аминокислотная последовательность

[QGQSGQG] [NLCTEHSFALDCRSYGGGSSGGSAVGLLAPPGLSGRSDQHGGSDIQMT
 QSPSSLSASVGDVRTITCSASSSVYYMYWFQKPGKAPKLWIYSTSNLASGVPSRFRSGSGSGTD
 YTLTISSMQPEDFATYYCQRRNYPYTFGQGTKLEIK] (SEQ ID NO: 896)
 [спейсер (SEQ ID NO: 645)] [huCD71Lc_TF02_2011 домен VL
 (SEQ ID NO: 897)]
 Аминокислотная последовательность
 [QGQSGQG] [NLCTEHSFALDCRSYGGGSSGGSISSGLLSGRSDNPGGSDIQMTQSPS
 SLSASVGDVRTITCSASSSVYYMYWFQKPGKAPKLWIYSTSNLASGVPSRFRSGSGSGTDYTLT
 ISSMQPEDFATYYCQRRNYPYTFGQGTKLEIK] (SEQ ID NO: 898)
 [спейсер (SEQ ID NO: 645)] [huCD71Lc_TF02_3011 домен VL
 (SEQ ID NO: 899)]
 Аминокислотная последовательность
 [QGQSGQG] [NLCTEHSFALDCRSYGGGSSGGSAVGLLAPPGLSGRSDNPGGSDIQMT
 QSPSSLSASVGDVRTITCSASSSVYYMYWFQKPGKAPKLWIYSTSNLASGVPSRFRSGSGSGTD
 YTLTISSMQPEDFATYYCQRRNYPYTFGQGTKLEIK] (SEQ ID NO: 900)
 [спейсер (SEQ ID NO: 645)] [huCD71Lc_TF02_2012 домен VL
 (SEQ ID NO: 901)]
 Аминокислотная последовательность
 [QGQSGQG] [NLCTEHSFALDCRSYGGGSSGGSISSGLLSGRSANPGGSDIQMTQSPS
 SLSASVGDVRTITCSASSSVYYMYWFQKPGKAPKLWIYSTSNLASGVPSRFRSGSGSGTDYTLT
 ISSMQPEDFATYYCQRRNYPYTFGQGTKLEIK] (SEQ ID NO: 902)
 [спейсер (SEQ ID NO: 645)] [huCD71Lc_TF02_3012 домен VL
 (SEQ ID NO: 903)]
 Аминокислотная последовательность
 [QGQSGQG] [NLCTEHSFALDCRSYGGGSSGGSAVGLLAPPGLSGRSANPGGSDIQMT
 QSPSSLSASVGDVRTITCSASSSVYYMYWFQKPGKAPKLWIYSTSNLASGVPSRFRSGSGSGTD
 YTLTISSMQPEDFATYYCQRRNYPYTFGQGTKLEIK] (SEQ ID NO: 904)
 [спейсер (SEQ ID NO: 645)] [huCD71Lc_TF02_2013 домен VL
 (SEQ ID NO: 905)]
 Аминокислотная последовательность
 [QGQSGQG] [NLCTEHSFALDCRSYGGGSSGGSISSGLLSGRSANIGGSDIQMTQSPS
 SLSASVGDVRTITCSASSSVYYMYWFQKPGKAPKLWIYSTSNLASGVPSRFRSGSGSGTDYTLT
 ISSMQPEDFATYYCQRRNYPYTFGQGTKLEIK] (SEQ ID NO: 906)
 [спейсер (SEQ ID NO: 645)] [huCD71Lc_TF02_3013 домен VL
 (SEQ ID NO: 907)]
 Аминокислотная последовательность
 [QGQSGQG] [NLCTEHSFALDCRSYGGGSSGGSAVGLLAPPGLSGRSANIGGSDIQMT
 QSPSSLSASVGDVRTITCSASSSVYYMYWFQKPGKAPKLWIYSTSNLASGVPSRFRSGSGSGTD
 YTLTISSMQPEDFATYYCQRRNYPYTFGQGTKLEIK] (SEQ ID NO: 908)

Пример 3. Получение и характеристика активируемых антител против CD71

Исследования, представленные в настоящем документе, разработаны для получения активируемых антител против CD71 по этому описанию.

Получали активируемые антитела против CD71 с различной эффективностью маскировки (т.е., показателем способности ММ активируемого антитела блокировать связывание АВ активируемого антитела с его мишенью). Пептиды TF01 и TF02 подвергали мутагенезу посредством укорачивания и аланинового сканирования, как описано в примере 2, и эти варианты маскирующих пептидов использовали для получения семейств активируемых антител против CD71 по настоящему описанию с диапазоном эффективности маскировки.

Связывание активируемых антител против CD71 по настоящему описанию с линией клеток NCI H292 (также обозначаемой в настоящем документе как H292) оценивали с использованием FACS. Кратко, клетки метили с использованием антитела huCD71 или активируемого антитела в указанных концентрациях и затем проводили детекцию с использованием меченого Alexa Fluor 647 вторичного антитела козы против IgG человека. Как показано на фиг. 2, для активируемых антител против CD71 по настоящему описанию показан диапазон эффективности маскировки по сравнению с исходным антителом против CD71 (huCD71 21.12 Ab).

Как показано на фиг. 3А, конъюгаты активируемого антитела huCD71 с лекарственным средством по настоящему описанию обладают сходным поведением с неконъюгированными активируемыми антителами и восстанавливают активность связывания антитела huCD71 при протеолитической активации.

Это исследование проводили с использованием активируемого антитела против CD71, обозначенного в настоящем документе как huCD71 TF01-2001, конъюгированного с MMAD через линкер val-cit (линкер-токсин обозначены в настоящем документе как vc-MMAD), и эта конструкция активируемого антитела содержит VH из SEQ ID NO: 5, VL из SEQ ID NO: 7, MM из SEQ ID NO: 16 и CM, содержащую последовательность ISSGLLSGRSDNH (SEQ ID NO: 406). Связывание обработанного uPA или интактного активируемого антитела huCD71 TF01-2001, конъюгированного с MMAD, с клетками H292 оценивали посредством FACS с использованием стандартного протокола мечения для FACS. Конъюгат активируемого антитела против CD71 с лекарственным средством, также обозначаемой в настоящем документе как "AADC", активировали посредством инкубации с uPA в течение ночи. На фиг. 3B показана способность активированного активируемого антитела против CD71 huCD71 TF01-2001, конъюгированного с MMAD через линкер val-cit (линкер-токсин обозначены в настоящем документе как v-MMAD или vc-MMAD), уничтожать клетки *in vitro* сходным образом с антителом против CD71 21.12-MMAD. Сходные результаты наблюдали, когда активируемое антитело из вариантов осуществления, конъюгированное с повреждающим нуклеиновую кислоту средством, тестировали в таких анализах уничтожения клеток.

Ксенотрансплантаты опухолей H292 обрабатывали контролем для изотипа DM4, huCD71-DM4 ADC и конъюгированным активируемым антителом против CD71 huCD71 TF02.13_2001-DM4 AADC, обладающим VH из SEQ ID NO: 5, VL из SEQ ID NO: 7, MM из SEQ ID NO: 309 (NLCTEHSALDCRSY) и CM, содержащей последовательность ISSGLLSGRSDNH (SEQ ID NO: 406). Опухоли выращивали в среднем до 150 мм³; затем мышей случайным образом распределяли на группы по восемь и на сутки 0 и 7 вводили дозы указанных тестируемых веществ. Результаты этого исследования показаны на фиг. 4. Средний объем опухоли ±SEM для каждой группы наносили на график. Как ADC, так и AADC индуцировали регрессию опухолей. Все конъюгированные с DM4 активируемые антитела, описанные в настоящем документе, получали из TCRS (The Chemistry Research Solution).

Фиг. 5 представляет собой график, изображающий результаты для ксенотрансплантатов опухолей рака молочной железы HCC1806 после обработки PBS в качестве контроля и двумя различными дозами, 1 мг/кг и 3 мг/кг, конъюгированного активируемого антитела против CD71 huCD71 TF02.13-2001-DM4 AADC, обладающего VH из SEQ ID NO: 5, VL из SEQ ID NO: 7, MM из SEQ ID NO: 309 (NLCTEHSALDCRSY) и CM1, содержащей последовательность ISSGLLSGRSDNH (SEQ ID NO: 406). Средний объем опухоли ±SEM для каждой группы нанесен на график. На фигуре 5 показано, что конъюгированные активируемые антитела против CD71 по этому описанию индуцируют полную регрессию опухолей для ксенотрансплантатов опухолей молочной железы HCC1806 при дозах, более низких, чем клинически приемлемые.

Фиг. 6A представляет собой график, изображающий способность антитела против CD71 по настоящему описанию (VH из SEQ ID NO: 5 и VL из SEQ ID NO: 7) связывать эпителиальные клетки первичной почки яванского макака, с наблюдаемой kd приблизительно 3 нМ в этом иллюстративном исследовании. В этом исследовании, связывание антитела по настоящему описанию с клетками проводили с использованием стандартного способа мечения FACS. Кратко, клетки метили с использованием антитела против CD71 или контроля для изотипа (пализумаба) по настоящему описанию в указанных концентрациях и затем проводили детекцию с использованием меченного Alexa Fluor 647 вторичного антитела козы против IgG человека.

На фиг. 6B показано, что антитело против CD71 huCD71 (VH из SEQ ID NO: 5 и VL из SEQ ID NO: 7) связывает CD71 человека и яванского макака, но не связывает CD71 мыши. В этом анализе, проводили абсорбцию рекомбинантного CD71 указанного типа (1 мкг/мл) на планшетах для ELISA и затем инкубировали с антителом против CD71 человека 21.12 в указанной концентрации, и затем проводили детекцию с использованием вторичного антитела козы против IgG человека с HRP и детекцию с Ultra TMB (Thermo Fisher Scientific) с использованием анализа и в соответствии со способами, известными специалистам в данной области.

Фиг. 6C представляет собой график, изображающий способность мышинового антитела против CD71 muM21 ("CD71 ms Ab") по настоящему описанию (VH из SEQ ID NO: 1 и VL из SEQ ID NO: 2) и гуманизованного антитела против CD71 Ab21.12 ("CD71 Hu Ab") по настоящему описанию (VH из SEQ ID NO: 5 и VL из SEQ ID NO: 7) связывать линию клеток BxPC3, происходящую из злокачественной опухоли поджелудочной железы человека, обоих с наблюдаемой kd приблизительно 3 нМ в этом иллюстративном исследовании. В этом исследовании связывание антител по настоящему описанию с клетками проводили с использованием стандартного способа мечения FACS. Кратко, клетки метили с использованием антитела против CD71 или контрольного антитела для изотипа IgG1 человека (пализумаба, "изотипа") по настоящему описанию в указанных концентрациях и затем проводили детекцию с использованием меченного Alexa Fluor 647 вторичного антитела козы против IgG человека или против IgG мыши.

Фиг. 7 представляет собой график, изображающий, что для однократной дозы активируемого антитела против CD71 по настоящему описанию показано продленное время полужизни по сравнению с исходным антителом CD71 при введении яванским макакам. В этом исследовании обезьянам проводили инъекции однократной дозы на сутки 0 5 мг/кг указанного антитела, где "антитело против CD71" пред-

ставляло собой антитело против CD71 человека 21.12 по настоящему описанию, и "активируемое антитело против CD71" представляло собой антитело против CD71 человека TF01.2 001 активируемое антитело по настоящему описанию. Общее количество IgG человека в сыворотке каждой обезьяны анализировали на указанные сутки с использованием сэндвич-ELISA против IgG человека.

Фармакокинетику и переносимость конъюгата huCD71 TF02.13-2001 DM4 с лекарственным средством у двух яванских макаков оценивали после однократной дозы 5 мг/кг (фиг. 8). Общие уровни в сыворотке IgG человека измеряли с использованием ап сэндвич-ELISA против IgG человека.

Исследования, изображенные на фиг. 7, 8 и 9, проводили в качестве части 3-недельного исследования переносимости (не окончательного); однократная доза, n=2. Продленная РК интактного активируемого антитела, которую наблюдали, согласовывалась с уменьшением связывания в нормальной ткани. Детектировали низкие циркулирующие уровни активированного конъюгированного активируемого антитела. Конъюгированное активируемое антитело являлось хорошо переносимым при 5 мг/кг. Не наблюдали доказательства специфической или неспецифической токсичности. Не присутствовало клинических признаков, потери массы, обнаружений с помощью клинической химии или гематологии.

На фиг. 9 показано, что для двух яванских макаков, которым вводили конъюгированное активируемое антитело против CD71 по этому описанию (антитело против huCD71 TF02.13-2001 DM4), не показано доказательств нейтропении (на основании количества нейтрофилов) или токсичности для печени (на основании уровней аланин-трансаминазы (ALT) или аспартат-трансаминазы (AST)).

Пример 4. Характеризация связывания и ингибирующей активности антитела против CD71

В этом примере показана способность антитела против CD71 по настоящему описанию ингибировать связывание рекомбинантного CD71 с его лигандом, трансферрином.

На фиг. 10 показано связывание лиганда рекомбинантного трансферрина человека (Tf) с рекомбинантным CD71 человека в отсутствие антитела против CD71 с использованием твердофазного анализа связывания ELISA. В этом исследовании константу диссоциации (K_d) приблизительно 1,6 нМ трансферрина для CD71 человека определили в этом примере. В этом анализе проводили абсорбцию рекомбинантного CD71 человека (1 мкг/мл) на планшетах для ELISA и затем инкубировали с указанной концентрацией биотинилированного лиганда трансферрина, с последующей детекцией связанного биотинилированного трансферрина с использованием детекции с стрептавидином-пероксидазой хрена (HRP) и Ultra TMB (Thermo Fisher Scientific) с использованием анализа и в соответствии со способами, известными специалистам в данной области.

На фиг. 11A показан эффект связывания между лигандом рекомбинантным трансферрином человека (Tf) и рекомбинантным CD71 человека в различных условиях с использованием твердофазного анализа связывания ELISA, включая связывание в присутствии антитела против CD71 по настоящему описанию. В частности, как показано на фиг. 11A, это исследование показало, что гуманизованное антитело против CD71 по настоящему описанию ("CD71 Ab21.12") ингибировало связывание между лигандом трансферрином и его рецептором CD71 по сравнению с контролем для изотипа. Результаты также показали, что это ингибирование являлось сходным с ингибированием связывания, показанным для другого, коммерчески доступного антитела мыши против CD71 человека - моноклонального антитела ("ОКТ9"). Результаты показывают также, что ни коммерчески доступное антитело кролика против CD71 человека - поликлональное антитело (LS-C334364, LS Bio), ни контроль для изотипа значительно не ингибировали связывание трансферрина с CD71, и активность связывания прекращали посредством добавления избыточного количества холодного трансферрина. В этом анализе проводили абсорбцию рекомбинантного белка CD71 человека (1 мкг/мл) на планшетах для ELISA и затем инкубировали с 0,6 нМ биотинилированного трансферрина в присутствии указанных концентраций антитела или трансферрина (где антитело против CD71 21.12 по настоящему описанию обладает VH из SEQ ID NO: 5 и VL из SEQ ID NO: 7), в качестве части анализа титрования. Связанный трансферрин детектировали с использованием детекции с конъюгированной со стрептавидином HRP и Ultra TMB с использованием анализа и в соответствии со способами, известными специалистам в данной области.

На фиг. 11B показано, что степень ингибирования связывания трансферрина с CD71 посредством известного моноклонального антитела против CD71 (ОКТ9) является значимо меньшей, чем степень ингибирования посредством антитела против CD71 21.12 по настоящему описанию. В этом анализе проводили абсорбцию рекомбинантного белка CD71 человека (1 мкг/мл) на планшетах для ELISA и затем инкубировали с 0,6 нМ биотинилированного трансферрина в присутствии указанных концентраций антитела против CD71 ОКТ9 или антитела против CD71 21.12 по настоящему описанию (антитела против CD71 21.12, обладающего VH из SEQ ID NO: 5 и VL из SEQ ID NO: 7), в качестве части анализа титрования. Связанный трансферрин детектировали с использованием конъюгированной со стрептавидином HRP и Ultra TMB с использованием анализа и в соответствии со способами, известными специалистам в данной области.

Пример 5. Экспрессия CD71 во множестве первичных и метастазирующих опухолей

В этом примере показано, что CD71 экспрессируется в широком множестве типов первичных и метастазирующих опухолей посредством иммуногистохимического (ИHC) окрашивания с использованием антитела против CD71.

На фиг. 12А, 12В и 12С показано, что CD71 экспрессирован на высоком уровне в большом количестве образцов первичных и метастазирующих опухолей, с использованием ИС окрашивания с использованием закупленного из коммерческого источника антитела против CD71 в микромассах тканей множества первичных и метастазирующих опухолей (ТМА). На фиг. 12А показано ИС окрашивание CD71 в злокачественной опухоли шейки матки (1), в злокачественной опухоли головы и шеи (2), в ксенотрансплантате H292 (3), при неходжскинской лимфоме (NHL) в лимфатических узлах (4), при NHL в ободочной кишке (5) и при NHL в желудке (6). На фиг. 12В показано ИС окрашивание CD71 в ТМА, состоящем из ядер метастазирующих опухолей, показывающее от умеренного до высокого уровня экспрессии CD71 в большинстве ядер. На фиг. 12С показано обобщение уровня ИС окрашивания CD71 в одном иллюстративном ТМА, показывающее, что для большого количества метастазирующих ядер, происходящих из множества источников, показан сильный сигнал CD71.

Пример 6. Эффективность *in vivo* активируемого антитела против CD71-AADC в модели ксенотрансплантата Raji

В этом примере показано, что активируемые антитела против CD71 человека, конъюгированные с токсинами (AADC), по настоящему описанию являются эффективными в модели ксенотрансплантата неходжскинской лимфомы (NHL) на мышах. Эта эффективность является специфической для антител против CD71 человека и является сравнимой или эквивалентной эффективности, показанной для конъюгата с лекарственным средством исходного антитела против CD71 человека.

На фиг. 13А показана эффективность различных конъюгатов с лекарственным средством активируемого антитела против CD71 в модели ксенотрансплантата NHL на мышах, где для конъюгатов с лекарственным средством активируемого антитела по настоящему описанию (CD71 TF02.18-2001-spdb-DM4, CD71 TF02.13-2001-spdb-DM4, и CD71 TF02.13.3001-spdb-DM4) показана значимо более высокая эффективность, чем для контроля изотипа (паливизумаба-spdb-DM4). На фиг. показано также, что для конъюгатов с лекарственным средством активируемого антитела по настоящему описанию показана эффективность, сравнимая с конъюгатом с лекарственным средством немаскированного антитела против CD71 (CD71 21.12-spdb-DM4). В этом исследовании, ксенотрансплантаты опухолей неходжскинской лимфомы (NHL) Raji у мышей выращивали до среднего объема 150 мм³. Затем мышей случайным образом распределяли на группы по восемь, и на сутки 1 и 8 вводили дозы по 5 мг/кг каждого указанного тестируемого вещества. Средний объем опухоли ±SEM наносили на график для каждой временной точки.

На фиг. 13В показана эффективность различных конъюгатов активируемого антитела против CD71 с лекарственным средством в модели ксенотрансплантата NHL на мышах, где для конъюгатов активируемого антитела с лекарственным средством по настоящему описанию (CD71 TF02.18-2001-vc-MMAE и CD71 TF02.13-3001-vc-MMAE) показана значимо более высокая эффективность, чем для контроля изотипа (паливизумаба-vc-MMAE). На фиг. 13В показано также, что для конъюгатов активируемого антитела с лекарственным средством по настоящему описанию показана эффективность, сравнимая с конъюгатом с лекарственным средством немаскированного антитела против CD71 (CD71 21.12-vc-MMAE). В этом исследовании ксенотрансплантаты опухолей неходжскинской лимфомы (NHL) Raji у мышей выращивали до среднего объема 150 мм³. Затем мышей случайным образом распределяли на группы по восемь и на сутки 1 и 8 вводили дозы по 3 мг/кг каждого указанного тестируемого вещества. Средний объем опухоли ±SEM наносили на график для каждой временной точки.

На фиг. 13С показана эффективность различных конъюгатов активируемого антитела против CD71 с лекарственным средством в модели ксенотрансплантата NHL на мышах, где для конъюгатов активируемого антитела с лекарственным средством по настоящему описанию (CD71 TF02.18-2001-vc-MMAD и CD71 TF02.13-3001-vc-MMAD) показана значимо более высокая эффективность, чем для контроля изотипа (паливизумаба-vc-MMAD). На фиг. 13С показано также, что для конъюгатов активируемого антитела с лекарственным средством по настоящему описанию показана эффективность, сравнимая с конъюгатом с лекарственным средством немаскированного антитела против CD71 (CD71 21.12-vc-MMAD). В этом исследовании, ксенотрансплантаты опухолей неходжскинской лимфомы (NHL) Raji у мышей выращивали до среднего объема 150 мм³. Затем мышей случайным образом распределяли на группы по восемь, и на сутки 1 и 8 вводили дозы по 0,5 или 1 мг/кг каждого указанного тестируемого вещества. Средний объем опухоли ±SEM наносили на график для каждой временной точки.

Пример 7. Переносимость антитела против CD71-ADC и активируемого антитела против CD71-AADC у яванского макака

В этом примере показано, что активируемые антитела против CD71 человека, конъюгированные с токсинами (AADC), по настоящему описанию являлись хорошо переносимыми у яванских макаков по сравнению с ADC соответствующего исходного антитела против CD71, на основании одного или нескольких считываемых гематологических показателей.

На фиг. 14А-14Г показано, что для конъюгатов активируемого антитела против CD71 с лекарственным средством (AADC) по настоящему описанию показана более высокая переносимость у яванских макаков на основании отсутствия заметных изменений каждого считываемого гематологического показателя, по сравнению с обезьянами, обработанными высокими или низкими дозами ADC соответствующего

шего исходного антитела против CD71. Следующие гематологические результаты наблюдали при обработке обезьян 5 мг/кг ADC исходного антитела против CD71: заметное уменьшение общего количества лейкоцитов (WBC) при обработке высокой дозой ADC (фиг. 14A), тяжелая нейтропения на сутки 8-11 при обработке высокой и низкой дозой ADC (фиг. 14B), заметное уменьшение количества лимфоцитов при обработке высокой дозой ADC (фиг. 14C), уменьшение количества моноцитов при обработке как высокой, так и низкой дозой ADC, с восстановлением количества моноцитов у животного, подвергнутого обработке низкой дозой, на сутки 11 (фиг. 14D), уменьшение количества эритроцитов при обработке как высокой, так и низкой дозой ADC (RBC) (фиг. 14E), заметное уменьшение количества гемоглобина (HGB) при обработке как высокой, так и низкой дозой ADC (фиг. 14F), и заметное уменьшение количества ретикулоцитов при обработке как высокой, так и низкой дозой ADC (фиг. 14G). Для обезьян, подвергнутых обработке ADC антитела против CD71, показано нормальное количество тромбоцитов (данные не представлены). По сравнению с этим для животных, подвергнутых обработке AADC активируемых антител против CD71 по настоящему описанию, не показано заметных изменений всех из этих считаваемых гематологических показателей (фиг. 14A-14F). В этом исследовании однократную дозу активируемого антитела против CD71 TF02.13-2001-spdb-DM4 ("AADC") по настоящему описанию, обладающего соотношением лекарственное средство-антитело (DAR) приблизительно 3,4, вводили яванским макакам в дозе 5 мг/кг, и антитело против CD71 21.12-spdb-DM4 ("ADC") по настоящему описанию вводили в дозе 5 мг/кг (низкая доза) и 7,5 мг/кг (высокая доза). Гематологические результаты получали для каждой обезьяны на указанные сутки исследования с использованием способов и методов, известных в данной области.

Пример 8. Экспрессия CD71 и чувствительность к опосредованной антителом против CD71 цитотоксичности во множестве линий клеток

В этом примере показано, что CD71 экспрессируется на высоких уровнях во многих происходящих из опухолей линиях клеток, и что для многих из этих линий клеток показана чувствительность к нацеливаемой антителом против CD71 цитотоксичности.

На фиг. 15 показано максимальное связывание или относительная экспрессия CD71 в указанных линиях клеток посредством анализа FACS. Окрашивание FACS проводили с использованием коммерчески доступного антитела против CD71, мышшиного моноклонального антитела, ОКТ9, затем конъюгированного с Alexa Fluor 647 вторичного антитела козы против антител мыши, где высота столбца для данной линии клеток соответствует относительному количеству образованного CD71 сигнала для этой линии клеток. Цвет столбца для данной линии клеток показывает относительную чувствительность соответствующей линии клеток в анализе цитотоксичности *in vitro*, где линию клеток обрабатывали антителом против CD71 21.12 по настоящему описанию в присутствии вторичного антитела против антител человека, конъюгированного с токсином MMAE. Линию клеток относили к категории "чувствительных", если цитотоксичность наблюдали с EC50 менее 1 нМ. Линию клеток относили к категории "умеренно чувствительных", если максимальное уничтожение составляло менее 50%, и EC50 превышала 1 нМ. Линию клеток относили к категории "устойчивых", если наблюдали цитотоксичность от отсутствующей до небольшой.

Пример 9. Экспрессия CD71 в линиях клеток HT29, VxPc3, Fadu и MDA MB 231

В этом примере показано, что активируемые антитела против CD71 человека по настоящему описанию связывают CD71 на множестве линий клеток с более высокой константой диссоциации, чем немаскированное антитело против CD7 человека по настоящему описанию, таким образом, показывая эффект маскировки на уменьшение связывания до активации.

На фиг. 16A-16D показан уровень связывания активируемых и исходных антител против CD71 по настоящему описанию с линиями клеток HT2 9 (фиг. 16A), VxPc3 (фиг. 16B), FaDu (фиг. 16C) и MDA MB 231 (фиг. 16D). В этом исследовании связывание антител по настоящему описанию с указанными линиями клеток проводили с использованием стандартного способа мечения FACS. Кратко, клетки метили с использованием указанных антител по настоящему описанию: антитело против CD71 человека (антитело против CD71 человека Ab21.12, "CD71-Ab") или одно из двух активируемых антител против CD71 человека (антитело против CD71 человека TF02.13-3001, "CD71-ActAb 1", или антитело против CD71 человека TF02.18-2001, "CD71-ActAb 2") в указанных концентрациях, и затем проводили детекцию с использованием меченного Alexa Fluor 647 вторичного антитела козы против IgG человека. В табл. 14 ниже показаны равновесные константы диссоциации на основании кривых связывания, изображенных на фиг. 14A-14D. Эти результаты показывают, что антитело против CD71 человека 21.12 (CD71-Ab) связывало все линии клеток со сходными Kd (0,39-0,81 нМ), в то время как связывание антитела против CD71 человека TF02.13-3001 (CD71-ActAb 1) и антитела против CD71 человека TF02.18-2001 (CD71-ActAb 2) с линиями клеток было значительно сдвинуто вправо (в 38-46 раз), что является показателем эффективности маскировки маскирующей группы.

Таблица 14. Иллюстративная наблюдаемая активность связывания с CD71 для активированных антител против CD71

Линия клеток	CD71-Ab		CD71-ActAb 1		CD71-ActAb 2		Bmax (MFI)
	Kd (нМ)	ME*	Kd (нМ)	ME*	Kd (нМ)	ME*	
FaDu	0,39	38	14,74	38	15,36	39	1000
HT29	0,51	45	23,02	45	19,74	39	700
MB231	0,84	46	38,84	46	31,99	38	500
VxPC3	0,81	43	35,18	43	36,35	43	400

*ME=эффективность маскировки

Пример 10. Цитотоксичность ADC антитела против CD71 для линий клеток HT29, VxPc3, FaDu и MDA MB 231

В этом примере показано, что конъюгаты антитела против CD71 человека с лекарственным средством по настоящему описанию обладают более высокой цитотоксичностью против множества линий клеток по сравнению с контрольным для изоформа ADC.

На фиг. 17A-17D показано, что антитело против CD71 человека по настоящему описанию, конъюгированное с различными токсинами, обладает более высокой цитотоксичностью *in vitro* против различных экспрессирующих CD71 линий клеток по сравнению с контрольным для изоформа ADC. В этом исследовании антитело против CD71 человека 21.12-ADC по настоящему описанию (конъюгированное с spdb-DM4, vc-MMAE или vc-MMAD) или контроль для изоформа (паливизумаб-ADC, конъюгированный с spdb-DM4, vc-MMAE или vc-MMAD) применяли в указанных концентрациях для HT29 (фиг. 17A), VxPc3 (фиг. 17B), FaDu (фиг. 17C) и MDA MB 231 (фиг. 17D). Цитотоксичность определяли как процент от популяции необработанных клеток, которую использовали в качестве контроля.

Пример 11. Цитотоксичность активируемого антитела против CD71 для клеток NHL Raji

В этом примере показано, что конъюгаты антител против CD71 человека с лекарственным средством (ADC) по настоящему описанию обладают более высокой цитотоксичностью против линии клеток Raji (неходжскинской лимфомы) по сравнению с конъюгатами активируемого антитела против CD71 человека с лекарственным средством (AADC) по настоящему описанию.

На фиг. 18 показано, что конъюгаты антитела против CD71 человека 21.12-ADC с лекарственным средством (ADC) по настоящему описанию (конъюгированные с spdb-DM4, vc-MMAE или vc-MMAD) обладали более высокой цитотоксичностью против клеток, происходящих из неходжскинской лимфомы Raji, чем либо конъюгаты соответствующего им активируемого антитела против CD71 человека TF02.18-2001-AADC с лекарственным средством (конъюгированные с spdb-DM4, vc-MMAE или vc-MMAD), либо конъюгаты активируемого антитела против CD71 человека TF02.13-3001-AADC с лекарственным средством (конъюгированные с spdb-DM4, vc-MMAE или vc-MMAD). Для антител против CD71 человека ADC показана сходная друг с другом цитотоксическая эффективность (с показанной IC50 ~ 0,1 нМ на основании сравнения с контрольным образцом) против линии клеток Raji. По сравнению с этим, для конъюгата активируемого антитела против CD71 человека с лекарственным средством (AADC) показан цитотоксический эффект, сходный или сравнимый с эффектом контрольного для изоформа ADC. В этом исследовании, различные конъюгаты антитела против CD71 человека с лекарственным средством и конъюгаты активируемого антитела против CD71 человека с лекарственным средством по настоящему описанию применяли в указанных концентрациях для клеток Raji. Цитотоксичность определяли как процент от популяции необработанных клеток, которую использовали в качестве контроля.

Пример 12. Анализ связывания CD71

В этом примере показано, что для активируемых антител против CD71 человека по настоящему описанию показан сдвиг аффинности связывания с рекомбинантным белком CD71 по сравнению с исходным антителом против CD71 по настоящему описанию.

Как показано в примерах, изображенных на фиг. 19, твердофазный анализ связывания использовали, чтобы показать связывание антител против CD71 человека по настоящему описанию. В этих примерах рекомбинантным белком CD71 человека (R&D Systems) покрывали никелированные планшеты для ELISA в концентрации 1 мкг/мл и затем проводили инкубацию с указанной концентрацией антитела против CD71 ("CD71 21.12") или активируемых антител против CD71 ("CD71.TF02.13-2001" или "CD71.TF02.18-2001"), где активируемые антитела анализировали в их неактивированной протеолитической форме. Количество связанного антитела детектировали посредством инкубации и детекции посредством антитела козы против антитела человека, конъюгированного с пероксидазой хрена, и детекции с Ultra TMB (Thermo Fisher Scientific).

Как изображено на фиг. 19, в иллюстративном анализе показано, что антитело против CD71 человека 21.12 связывалось с Kd ~0,3 нМ. Константы связывания активируемого антитела против CD71 человека TF02.18-2001 и активируемого антитела против CD71 человека TF02.13-2001 сдвинуты вправо в результате их соответствующей эффективности маскировки (в 9 и 42 раз, соответственно).

Таблица 15. Иллюстративная наблюдаемая активность связывания с CD71 для активированных антител против CD71

Антитело	Kd (нМ) 1 мкг/мл антигена CD71	МЕ*
CD71 21.12	0,3	-
CD71 TF02.13-2001	13	42
CD71 TF02.18-2001	3,0	9

*МЕ=эффективность маскировки

Пример 13. Эффективность *in vivo* активируемого антитела против CD71-AADC в модели ксенотрансплантата полученной от пациента неходжскинской лимфомы

В этом примере показано, что активируемое антитело против CD71 человека, конъюгированное с токсином по настоящему описанию (AADC), является эффективным в модели ксенотрансплантата полученной от пациента неходжскинской лимфомы (NHL), и что эта эффективность является сравнимой или лучшей, чем эффективность, наблюдаемая для конъюгата исходного антитела против CD71 человека с лекарственным средством (ADC).

На фиг. 20А и 20В с использованием модели на мышах ксенотрансплантата полученной от пациента первичной опухоли неходжскинской лимфомы (NHL) показано, что для мышей, обработанных активируемыми антителами против huCD71-AADC по настоящему описанию, показана эффективность в зависимости от времени, сходная или превышающая эффективность соответствующих им антител против huCD71-ADC по настоящему описанию. В этом исследовании каждый из двух ксенотрансплантатов полученных от пациентов NHL (помеченных как LY2214 и LY0257, Crown Bioscience) обрабатывали контрольным для изотипа ADC (паливизумабом, конъюгированным с spdb-DM4, "изотип-ADC"); активируемым антителом против huCD71 21.12-ADC по настоящему описанию, конъюгированным с spdb-DM4 ("CD71-ADC") по настоящему описанию; или активируемым антителом против huCD71 TF02.13.3001 по настоящему описанию, конъюгированным с spdb-DM4 ("CD71-AADC"). В каждом из этих примеров ксенотрансплантаты опухолей выращивали до среднего объема 150 мм³; затем мышам случайным образом распределяли на группы по 4, и на сутки 1 и 7 вводили дозы 5 мг/кг указанных тестируемых веществ. Средний объем опухоли ±SEM наносили на график для каждой временной точки.

Пример 14. Цитотоксичность антитела против CD71-ADC для множества линий клеток, происходящих из колоректальных злокачественных опухолей

В этом примере показано, что для конъюгатов антител против CD71 человека с лекарственным средством (ADC) по настоящему описанию показана более высокая цитотоксичность против множества линий клеток, происходящих из колоректальных злокачественных опухолей (CRC) по сравнению с контрольными для изотипа ADC.

На фиг. 21А-21Н показано, что конъюгаты антител против CD71 человека 21.12 (ADC) по настоящему описанию, конъюгированные либо с spdb-DM4, либо с vc-MMAE, обладают более высокой цитотоксичностью против множества линий клеток, происходящих из CRC, чем цитотоксичность антитела того же изотипа (chKTI, химерного человеческого антитела IgG1 против ингибитора трипсина сои), конъюгированного либо с spdb-DM4, либо с vc-MMAE. Происходящие из CRC линии клеток, обработанные ADC, представляли собой SW1417, SW48, Ls411N, Lovo, HCT116, DLD1, Ls174T и SW480. Для ADC антител против CD71 человека показана сходная друг с другом цитотоксическая эффективность против линий клеток. В этом исследовании различные конъюгаты антител против CD71 с лекарственным средством по настоящему описанию и конъюгаты антител того же изотипа с лекарственным средством применяли для клеток в указанных концентрациях. Цитотоксичность определяли как процент от популяции необработанных клеток, которую использовали в качестве контроля.

На фиг. 22А и 22В показано, что для конъюгатов антител против CD71 человека 21.12-ADC с лекарственным средством (ADC) по настоящему описанию, конъюгированных с vc-MMAE или vc-MMAD (CD71 21.12 -vc-MMAE, CD71 21.12 -vc-MMAD), показана более высокая цитотоксичность против происходящих из HT29 CRC клеток, чем цитотоксичность конъюгата соответствующего им активируемого антитела против CD71 человека TF02.18-2001-AADC с лекарственным средством, конъюгированного с vc-MMAE или vc-MMAD (CD71 TF02.18-2001-vc-MMAE, CD71 TF02.18-2001-vc-MMAD), конъюгата активируемого антитела против CD71 человека TF02.13-3001-AADC с лекарственным средством, конъюгированного с vc-MMAE или vc-MMAD (CD71 TF02.13-3001-vc-MMAE, CD71 TF02.13-3001-vc-MMAD), или контроля изотипа (паливизумаба-ADC), конъюгированного с vc-MMAE или vc-MMAD (изотип-vc-MMAE, изотип-vc-MMAD). В этом исследовании различные конъюгаты антитела против CD71 с лекарственным средством и конъюгаты активируемого антитела с лекарственным средством по настоящему описанию, так же как изотип-ADC, применяли в указанных концентрациях для клеток HT29. Цитотоксичность определяли как процент от популяции необработанных клеток, которую использовали в качестве контроля.

Пример 15. Эффективность *in vivo* активируемого антитела против CD71-AADC в модели ксенотрансплантата неходжскинской лимфомы

В этом примере показано, что активируемые антитела против CD71 человека, конъюгированные с токсинами (AADC) по настоящему описанию, являются эффективными в модели на мышах ксенотрансплантата неходжскинской лимфомы (NHL). Эта эффективность является специфической для антител против CD71 человека и является сравнимой или эквивалентной эффективности, показанной для конъюгатов исходного антитела против CD71 человека с лекарственным средством.

На фиг. 23А показана эффективность различных конъюгатов активируемого антитела против CD71 с лекарственным средством в модели на мышах ксенотрансплантата NHL (Raji), где для конъюгатов активируемого антитела с лекарственным средством по настоящему описанию (CD71 TF02.18-2001-spdb-DM4, CD71 TF02.13-2001-spdb-DM4, и CD71 TF02.13.3001-spdb-DM4) показана значительно более высокая эффективность, чем для контроля изотипа (паливизумаба-spdb-DM4). На фиг.23А показано также, что для конъюгатов активируемого антитела с лекарственным средством по настоящему описанию показана эффективность, сравнимая с конъюгатом с лекарственным средством немаскированного антитела против CD71 (CD71 21.12-spdb-DM4). В этом исследовании ксенотрансплантаты опухолей неходжскинской лимфомы (NHL) Raji у мышей выращивали до среднего объема 150 мм³. Затем мышей случайным образом распределяли на группы по восемь и на сутки 1 и 8 вводили дозы по 5 мг/кг каждого указанного тестируемого вещества. Средний объем опухоли±SEM наносили на график для каждой временной точки.

На фиг. 23В показана эффективность различных конъюгатов активируемого антитела против CD71 с лекарственным средством в модели на мышах ксенотрансплантата NHL (Raji), где для конъюгатов активируемого антитела с лекарственным средством по настоящему описанию (CD71 TF02.18-2001-vc-MMAE и CD71 TF02.13-3001-vc-MMAE) показана значительно более высокая эффективность, чем для контроля изотипа (паливизумаба-vc-MMAE). На фиг. 23В показано также, что для конъюгатов активируемого антитела с лекарственным средством по настоящему описанию показана эффективность, сравнимая с конъюгатом с лекарственным средством немаскированного антитела против CD71 (CD71 21.12-vc-MMAE). В этом исследовании ксенотрансплантаты опухолей неходжскинской лимфомы (NHL) Raji у мышей выращивали до среднего объема 150 мм³. Затем мышей случайным образом распределяли на группы по восемь и на сутки 1 и 8 вводили дозы по 3 мг/кг каждого указанного тестируемого вещества. Средний объем опухоли+SEM наносили на график для каждой временной точки.

Пример 16. Эффективность *in vivo* активируемого антитела против CD71-AADC в модели ксенотрансплантата немелкоклеточной карциномы легких

В этом примере показано, что активируемые антитела против CD71 человека, конъюгированные с токсинами (AADC) по настоящему описанию, являются эффективными в модели на мышах ксенотрансплантата немелкоклеточной карциномы легких (NSCLC) на протяжении диапазона доз. Эта эффективность является специфической для антител против CD71 человека и является сравнимой или эквивалентной эффективности, показанной для конъюгатов исходного антитела против CD71 человека с лекарственным средством.

На фиг. 24А и 24В показана эффективность конъюгатов активируемого антитела против CD71 с лекарственным средством в модели на мышах ксенотрансплантата NSCLC, где для каждого из конъюгатов активируемого антитела с лекарственным средством по настоящему описанию (CD71 TF02.13-3001-spdb-DM4, CD71 TF02.13-2001-spdb-DM4, CD71 TF01-2001-PEG2-VC-MMAD) в указанных дозах (5 мг/кг, 3 мг/кг и 1 мг/кг) показана значительно более высокая эффективность, чем для контроля изотипа (паливизумаба-spdb-DM4 или паливизумаба-PEG2-vc-MMAD), введенного в дозе 5 мг/кг. На фиг. показано также, что для конъюгатов активируемого антитела с лекарственным средством по настоящему описанию показана эффективность, сравнимая с конъюгатом с лекарственным средством немаскированного антитела против CD71 (CD71 21.12-spdb-DM4 или CD71 21.12-PEG2-VC-MMAD) в дозе 5 мг/кг. В этом исследовании ксенотрансплантаты опухолей NSCLC H292 у мышей выращивали до среднего объема 150 мм³. Затем мышей случайным образом распределяли на группы по восемь, и на сутки 1 и 8 вводили дозы указанного количества каждого указанного тестируемого вещества. Средний объем опухоли±SEM наносили на график для каждой временной точки.

Пример 17. Эффективность *in vivo* активируемого антитела против CD71-AADC *in vivo* в модели ксенотрансплантата аденокарциномы поджелудочной железы

В этом примере показано, что активируемые антитела против CD71 человека, конъюгированные с токсинами (AADC) по настоящему описанию, являются эффективными в модели на мышах ксенотрансплантата аденокарциномы поджелудочной железы ВхРС3 на протяжении диапазона доз. Эта эффективность является специфической для антител против CD71 и является сравнимой или эквивалентной эффективности, показанной для конъюгата исходного антитела против CD71 человека с лекарственным средством, и/или более высокой, чем эффективность контрольного для изотипа ADC.

На фиг. 25 показана эффективность различных конъюгатов активируемого антитела против CD71 с лекарственным средством в модели на мышах ксенотрансплантата ВхРС3, где для каждого из конъюгатов активируемого антитела с лекарственным средством по настоящему описанию (CD71 TF02.13-2001-

spdb-DM4, CD71 TF02.13-3001-spdb-DM4, и CD71 TF02.13-3001-vc-MMAE) в указанных дозах показана значительно более высокая эффективность, чем для контроля изотипа (паливизумаба-spdb-DM4 при 5 мг/кг и для паливизумаба-vc-MMAE при 3 мг/кг). На фиг. 25 показано также, что для конъюгатов активируемого антитела с лекарственным средством по настоящему описанию показана эффективность, сравнимая с конъюгатом с лекарственным средством немаскированного антитела против CD71 (CD71 21.12-spdb-DM4 при 5 мг/кг и CD71 21.12-vc-MMAE при 3 мг/кг). В этом исследовании, ксенотрансплантаты опухолей VxPC3 у мышей выращивали до среднего объема 150 мм³. Затем мышей случайным образом распределяли на группы по восемь, и на сутки 1 вводили дозы указанного количества каждого указанного тестируемого вещества. Средний объем опухоли \pm SEM наносили на график для каждой временной точки.

Пример 18. Эффективность *in vivo* активируемого антитела против CD71-AADC в модели ксенотрансплантата полученной от пациента неходжскинской лимфомы

В этом примере показано, что активируемое антитело против CD71 человека, конъюгированное с токсинами по настоящему описанию (AADC), является эффективным в модели ксенотрансплантата полученной от пациента неходжскинской лимфомы (NHL), и что эта эффективность является сравнимой или лучшей, чем эффективность, наблюдаемая для конъюгата исходного антитела против CD71 человека с лекарственным средством (ADC).

На фиг. 26А и 26В с использованием модели на мышах ксенотрансплантата полученной от пациента первичной опухоли неходжскинской лимфомы (NHL), показано, что для мышей, обработанных активируемыми антителами против hu CD71-AADC (CD71 TF02.13-3001-spdb-DM4 и CD71 TF02.13-3001-vc-MMAD) по настоящему описанию, показана эффективность в зависимости от времени, сходная или превышающая эффективность соответствующих им антител против huCD71-ADC по настоящему описанию. В этом исследовании каждый из двух ксенотрансплантатов полученных от пациентов NHL (помеченных как LY2214 и LY0257, Crown Bioscience) обрабатывали контрольным для изотипа паливизумабом ADC, конъюгированным с spdb-DM4 (изотип-spdb-DM4") или vc-MMAD ("изотип-vc-MMAD"); конъюгатами антитела с лекарственным средством по настоящему описанию против huCD71 21.12-spdb-DM4 или анти-huCD71 21.12-vc-MMAD; или активируемыми антителами по настоящему описанию против hu CD71 TF02.13-3001-spdb-DM4 и против huCD71 TF02.13-3001-vc-MMAD. В каждом из этих примеров ксенотрансплантаты опухолей выращивали до среднего объема 150 мм³; затем мышей случайным образом распределяли на группы по 4 и на сутки 1 и 7 вводили дозы указанных тестируемых веществ в указанных дозах. Средний объем опухоли \pm SEM наносили на график для каждой временной точки.

Пример 19. Эффективность *in vivo* активируемого антитела против CD71-AADC в моделях ксенотрансплантатов, полученных от пациентов

В этом примере показано, что активируемое антитело против CD71 человека, конъюгированное с токсинами по настоящему описанию (AADC), является эффективным в различных моделях ксенотрансплантатов, полученных от пациентов, и что эта эффективность превышает эффективность контрольного для изотипа ADC.

На фиг. 27А показано, что с использованием модели на мышах ксенотрансплантата полученной от пациента опухоли легкого (CTG-0166), для мышей, обработанных активируемыми анти-hu CD71-AADC (CD71 TF02.13-3001-spdb-DM4) по настоящему описанию, показана эффективность в зависимости от времени, превышающая эффективность соответствующего им контрольного для изотипа ADC (chKTI, химерного человеческого антитела IgG1 против ингибитора трипсина сои, конъюгированного с spdb-DM4, "изотип-spdb-DM4"). На фиг. 27В показано, что с использованием модели на мышах ксенотрансплантата полученной от пациента опухоли эндометрия (CTG-0774), для мышей, обработанных активируемыми антителами против hu CD71-AADC (CD71 TF02.13-3001-spdb-DM4) по настоящему описанию, показана эффективность в зависимости от времени, превышающая эффективность соответствующего им контрольного для изотипа ADC (chKTI, конъюгированного с spdb-DM4, "изотип-spdb-DM4"). В другом исследовании с использованием модели на мышах ксенотрансплантата полученной от пациента опухоли холангиокарциномы (злокачественной опухоли желчных протоков) (CTG-1941), для мышей, обработанных активируемыми антителами против hu CD71-AADC (CD71 TF02.13-3001-vc-MMAE) по настоящему описанию, показана эффективность в зависимости от времени, превышающая эффективность соответствующего им контрольного для изотипа ADC (chKTI, химерного человеческого антитела IgG1 против ингибитора трипсина сои, конъюгированного с spdb-DM4). В каждом из этих примеров ксенотрансплантаты опухолей выращивали до среднего объема 150 мм³; затем мышей случайным образом распределяли на группы по 4, и на сутки 1 вводили дозы указанного количества каждого из указанных тестируемых веществ. Средний объем опухоли \pm SEM наносили на график для каждой временной точки. ПРИМЕР 20: Анализ связывания CD71

В этом примере показано, что для активируемых антител против CD71 человека по настоящему описанию показан сдвиг аффинности связывания с рекомбинантным белком CD71 по сравнению с исходным антителом против CD71 по настоящему описанию.

Как показано в примерах, изображенных на фиг. 28, твердофазный анализ связывания использова-

ли, чтобы показать связывание антител против CD71 человека антитела по настоящему описанию. В этих примерах рекомбинантным белком CD71 человека (R&D Systems) покрывали медные или никелированные планшеты для ELISA в концентрации 1 мкг/мл, и затем проводили инкубацию с указанной концентрацией антитела против CD71 ("CD71 21.12") или активируемых антител против CD71 ("CD71.TF01-2001", "CD71.TF02-2001", "CD71.TF02.13-2001" или "CD71.TF02.18-2001"), где активируемые антитела анализировали в их нерасщепленной форме. Количество связанного антитела детектировали посредством инкубации и детекции посредством антитела козы против антитела человека, конъюгированного с пероксидазой хрена, и детекции с Ultra TMB (Thermo Fisher Scientific).

Как изображено на фиг. 28, в иллюстративном анализе показано, что антитело против CD71 человека 21.12 антитело связывалось с Kd ~0,14 нМ. Константы связывания активируемых антител против CD71 сдвинуты вправо в результате их соответствующей эффективности маскировки.

Таблица 16. Иллюстративная наблюдаемая активность связывания с CD71 для активируемых антител против CD71

Антитело	Kd (нМ)		МЕ*
	1 мкг/мл	антигена CD71	
CD71 21.12	0,14		-
CD71 TF01-2001	69,99		500
CD71 TF02-2001	21,45		153
CD71 TF02.13-2001	9,14		65
CD71 TF02.18-2001	1,59		11

*МЕ=эффективность маскировки

Пример 21. Экспрессия CD71 в нормальных тканях человека и яванского макака

В этом примере показано, что CD71 экспрессируется в большом множестве нормальных тканей человека и яванского макака, посредством иммуногистохимического (ИНС) окрашивания с использованием антитела против CD71.

В табл. 17 показано, что CD71 экспрессируется в конкретных образцах нормальных тканей человека и яванского макака, с использованием окрашивания ИНС с использованием закупленного из коммерческого источника антитела против CD71 (антитела mAb кролика против CD71 IgG; D7G9X, Cell Signaling Tech.). В табл. 17 показано обобщение относительного уровня окрашивания ИНС CD71 во множестве фиксированных формалином погруженных в парафин нормальных тканей человека и яванского макака, где каждый знак плюс ("+") соответствует более высокому уровню окрашивания, и каждый знак минус ("-").

Таблица 17. ИНС анализ экспрессии CD71 в нормальных тканях FFPE

Тип ткани	Яванский макак	Человек
Кость	+	++
Молочная железа	-	-
Мозг	+	+
Ободочная кишка	-	-
Пищевод	-	-
Сердце	-	-
Почка	+	-/+
Печень	-	-
Легкое	-	++ (в небольшом количестве клеток)
Нерв	+++	++
Яичник	+	+
Поджелудочная железа	-	-
Предстательная железа	-	-
Кожа	N/A	-/+
Тонкий кишечник	+	-
Селезенка	-	-
Желудок	-/+	+
Поперечнополосатая/скелетная мышца	-	-
Яичко	-	+
Матка	-	-/+

Пример 22. Экспрессия CD71 во множестве первичных и метастазирующих опухолей

В этом примере показано, что CD71 экспрессируется в большом количестве и разнообразии полученных от пациентов опухолей по иммуногистохимическому (ИНС) окрашиванию с использованием антитела против CD71.

В табл. 18 показано, что CD71 на умеренном или высоком уровне экспрессируется в большом количестве и разнообразии образцов опухолей, полученных от пациента, с использованием окрашивания ИНС с использованием закупленного из коммерческих источников антитела против CD71 на микромассивах множества тканей опухолей, полученных от пациентов (ТМА). В табл. 18 показано обобщение уровня

ИНС окрашивания CD71 в ТМА, показывающее, что в большом количестве образцов ядер, полученных от множества пациентов, показан сильный сигнал CD71. Количество в скобках после каждого типа злокачественных опухолей показывает количество полученных от индивидуального пациента образцов.

Таблица 18. Анализ ИНС экспрессии CD71 в полученных от пациентов злокачественных опухолях

Тип злокачественной опухоли (общее количество образцов)	Образцы с показателем ИНС (%)		
	0	1	2/3
Колоректальный рак (228)	1 (0,4)	20 (8,8)	207 (90,8)
Рак поджелудочной железы (106)	0 (0)	26 (24,5)	90 (75,5)
мелкоклеточный Рак легкого (8)	2 (25)	4 (50)	2 (25)
Немелкоклеточный рак легкого (42)	2 (3,2)	26 (41,9)	34 (54,8)
Рак яичника (53)	3 (7,1)	19 (45,2)	20 (47,6)
Плоскоклеточная карцинома головы и шеи (53)	3 (5,7)	20 (38)	30 (57)
Рак молочной железы (41)	1 (2,4)	15 (36,6)	57 (61,0)
Рак желудка (17)	0 (0)	6 (35,3)	11 (64,7)
Рак пищевода (14)	0 (0)	7 (50)	7 (50)

Пример 23. Анализ связывания Fab против CD71

В этом примере показано, что для антигенсвязывающего фрагмента (Fab) антитела против CD71 человека по настоящему описанию, полученного из антитела против CD71 человека по настоящему описанию, показана аффинность связывания с рекомбинантным белком CD71 человека и яванского макака.

Антигенсвязывающий фрагмент Fab получали посредством расщепления антитела против CD71 21.12 по настоящему описанию с использованием фермента папаина в соответствии с известными протоколами, для получения фрагмента Fab антитела против CD71. Фрагмент Fab антитела против CD71 по настоящему описанию анализировали по связыванию с рекомбинантным белком CD71 человека или яванского макака посредством измерения кинетики скоростей связывания и диссоциации в сериях разведений 1:3 фрагмента Fab с иммобилизованным на субстрате рекомбинантным белком CD71 (Octet system, ForteBio). Рекомбинантные белки CD71 содержали гексагистидиновую (His₆) пептидную метку, посредством которой белок иммобилизовывали на содержащем Ni-NTA (нитрилотриуксусную кислоту) субстрате. Результаты показаны в табл. 19.

Таблица 19. Кинетика связывания Fab антитела против CD71 с CD71 человека и яванского макака

Мишень	K_{on} (1/М с)	k_{dis} (с ⁻¹)	K_d (нМ)
CD71-His ₆ человека	$6,64 \times 10^5$	$3,98 \times 10^{-3}$	14
CD71-His ₆ яванского макака	$3,90 \times 10^5$	$5,59 \times 10^{-3}$	6

Пример 24. Гистопатология для яванских макаков после обработки ADC

В этом примере описано исследование, в котором для яванского макака, обработанного конъюгатом антитела против CD71 человека с лекарственным средством (ADC) по настоящему описанию, показаны гистопатологические аномалии в результате токсичности ADC.

Каждому из двух самцов яванских макаков вводили однократную внутривенную дозу ADC по настоящему описанию (CD71 21.12-spdb-DM4) в дозе либо 5 мг/кг, либо 7,5 мг/кг. Экземпляр после введения дозы 7,5 мг/кг затем подвергали эвтаназии на сутки 11 исследования из-за агонии и его ткани исследования. Исследование посредством световой микроскопии ограниченной выборки тканей выявило выраженные, взаимосвязанные повреждения кишечника (например, изъязвление, воспаление, кровоизлияние, избыточный рост бактерий и/или фибринозно-некротический выпот в ободочной кишке, двенадцатиперстной кишке и тощей кишке). Для экземпляра показаны также кровоизлияние в легких, некроз, воспаление и бактерии, позволяющие предполагать вторичную бактериемию. Наблюдали также изъязвление и бактерии на языке. Отмечена также значительная лимфоидная гиперплазия селезенки.

Агонию экземпляра можно отнести, например, к скоротечным и обширным повреждениям кишечника, так же как к вторичным системным повреждениям (например, в легком). Развитие поврежденных кишечника и системных повреждений можно отнести, например, к наблюдаемому значительному истощению миелоидных клеток костного мозга бедренной кости и/или клинически наблюдаемой нейтропении.

Пример 25. Экспрессия CD71 на линиях клеток H292, HCC1806 и MDA MB 231

В этом примере показано, что активируемые антитела против CD71 человека по настоящему описанию и конъюгаты активируемого антитела с лекарственным средством против CD71 человека по настоящему описанию связывают CD71 на множестве линий клеток с более высокой константой диссоциа-

ции, чем немаскированное антитело против CD71 человека по настоящему описанию, таким образом, показывая эффект маскировки на уменьшение связывания до активации.

На фиг. 29А, 29В и 29С показан уровень связывания активируемых антител против CD71, конъюгатов активируемого антитела с лекарственным средством, и исходных антител по настоящему описанию с линиями клеток MDA MB 231 (фиг. 29А), H292 (фиг. 29В) и HCC1806 (фиг. 29С). В этом исследовании связывание антител по настоящему описанию с указанными линиями клеток проводили с использованием стандартного способа мечения FACS. Кратко клетки метили с использованием указанных антител или активируемых антител по настоящему описанию: контрольного для изотипа антитела (паливизумаба), антитела против CD71 человека (антитела против CD71 человека Ab 21.12), активируемых антител против CD71 человека (антитела против CD71 человека TF02.13-2001 или антитела против CD71 человека TF02.13-3001). Кроме того, клетки метили также с использованием контрольного для изотипа ADC (паливизумаба-vc-MMAE), конъюгата антитела против CD71 человека с лекарственным средством (ADC) по настоящему описанию (CD71 Ab21.12-PEG2-vc-MMAD, CD71 Ab 21.12-vc-MMAE, или CD71 Ab 21.12-spdb-DM4), или конъюгата активируемого антитела с лекарственным средством (AADC) по настоящему описанию: CD71 TF02.13-3001-PEG2-vc-MMAD, CD71 TF02.13-3001-vc-MMAE, CD71 TF02.13-2001-spdb-DM4 или CD71 TF02.13-3001-spdb-DM4) в указанных концентрациях и затем проводили детекцию с использованием меченного Alexa Fluor 647 вторичного антитела козы против IgG человека.

В табл. 20 ниже показаны равновесные константы диссоциации и значения $V_{\text{макс}}$ на основании кривых связывания, показанных на фиг. 29А-29С. Эти результаты показывают, что антитело против CD71 человека Ab 21.12 связывало все линии клеток со сходными K_d , в то время как для связывания активируемых антител и конъюгатов активируемого антитела с лекарственным средством против CD71 человека по настоящему описанию с линиями клеток показана значимо более высокая K_d , что является показателем эффективности маскировки маскирующей группы в активируемых антителах по настоящему описанию.

Таблица 20. Иллюстративная наблюдаемая активность связывания CD71 для связывающих антител против CD71

Вещество	MDA MB231, Kd (нМ)	H292, Kd (нМ)	H292, Eмакс. (MFI)	HCC1806, Kd (нМ)
Ab 21.12	1,032	1,533	1824	5,0
Ab 21.12-PEG2-vc-MMAD	1,471	-	-	-
Ab 21.12-vc-MMAE	-	1,328	1597	6,4
Ab 21.12-spdb-DM4	1,238	-	-	-
TF02.13-2001	-	92,32	2208	~200
TF02.13-2001-PEG2-vc-MMAD	-	-	-	-
TF02.13-2001-vc-MMAE	-	-	-	-
TF02.13-2001-spdb-DM4	-	-	-	~200
TF02.13-3001	30,60	52,12	1821	~200
TF02.13-3001-PEG2-vc-MMAD	52,58	-	-	-
TF02.13-3001-vc-MMAE	-	53,78	1848	-
TF02.13-3001-spdb-DM4	46,92	-	-	~200
Изотип	-	-	-	-
Изотип-vc-MMAE	-	57,05	10,64	-

Пример 26. Связывание активируемых антител против CD71 с модифицированными субстратами

В этом примере показано, что активируемые антитела против CD71 человека по настоящему описанию связывают CD71 на линиях клеток и *in vitro* с более высокой константой диссоциации, чем немаскированное антитело против CD71 человека по настоящему описанию, таким образом, показывая эффект маскировки на уменьшение связывания до активации.

На фиг. 30А и 30В показан уровень связывания активируемых антител против CD71 и исходных антител по настоящему описанию с линией клеток H292. В этом исследовании связывание антител по настоящему описанию с указанными линиями клеток проводили с использованием стандартного способа мечения FACS. Кратко, клетки метили с использованием указанных антител или активируемых антител по настоящему описанию: контрольного для изотипа антитела (паливизумаба), антитела против CD71 человека (антитела против CD71 человека Ab 21.12), активируемых антител против CD71 человека (антитела против CD71 человека TF02.13-3001, TF02.13-3007, TF02.13-3008, TF02.13-3011, TF02.13-3012, TF02.13-3013, TF02.13-2001, TF02.13-2007, TF02.13-2008, TF02.13-2011, TF02.13-2012, TF02.13-2013), где активируемые антитела анализировали в их нерасщепленной форме. Эти активируемые антитела содержали легкую цепь из соответствующим образом названных последовательностей, перечисленных выше в табл. С. Клетки метили с использованием указанного тестируемого вещества в указанных концентрациях, и затем проводили детекцию с использованием меченного Alexa Fluor 647 вторичного антитела козы против IgG человека.

На фиг. 30С показан уровень связывания активируемых антител против CD71 и исходных антител по настоящему описанию с CD71 человека в твердофазном анализе связывания ELISA. В этих примерах рекомбинантным белком CD71 человека (R&D Systems) покрывали медные или никелированные планшеты для ELISA в концентрации 1 мкг/мл и затем проводили инкубацию с указанной концентрацией

антитела против CD71 (антитела против CD71 человека Ab 21.12) или активируемого антитела против CD71 (антитела против CD71 человека TF02.13-3001, TF02.13-3007, TF02.13-3008, TF02.13-3011, TF02.13-3013, TF02.13-2001, TF02.13-2007, TF02.13-2008, TF02.13-2011, TF02.13-2012, TF02.13-2013), где активируемые антитела анализировали в их нерасщепленной форме. Количество связанного антитела детектировали посредством инкубации и детекции посредством антитела козы против антитела человека, конъюгированного с пероксидазой хрена, и детекции с Ultra TMB (Thermo Fisher Scientific).

В табл. 21 ниже показаны равновесные константы диссоциации на основании кривых связывания, показанных на фиг. 30A-30D. Эти результаты показывают, что активируемые антитела и конъюгаты активируемого антитела с лекарственным средством против CD71 человека связываются с линией клеток и со связанным с твердой фазой CD71 со значительно более низкой аффинностью, чем исходное антитело против CD71, что является показателем эффективности маскировки маскирующей группы.

Таблица 21. Иллюстративная наблюдаемая активность связывания CD71 для связывающих антител против CD71

Вещество	H292, Kd (нМ)	ELISA, Kd (нМ)
Ab 21.12	0,4412	0,2553 0,1624
Изотип	~22544	-
TF02.13-3001	10,17	0,8132
TF02.13-3007	86,66	2,210
TF02.13-3008	97,79	2,613
TF02.13-3011	67,36	0,7778
TF02.13-3013	78,27	4,912
TF02.13-2001	27,50	2,529
TF02.13-2007	70,27	-
TF02.13-2008	89,99	15,12
TF02.13-2011	57,15	4,274
TF02.13-2012	39,15	1,636
TF02.13-2013	70,27	3,248

Пример 27. Цитотоксичность AADC и ADC антител против CD71 для линий клеток, происходящих из злокачественных опухолей кожи и легкого

В этом примере показано, что для конъюгатов антитела с лекарственным средством (ADC) и конъюгатов активируемого антитела с лекарственным средством (AADC) против CD71 человека по настоящему описанию показана более высокая цитотоксичность против линий клеток, происходящих из аденокарциномы легкого и плоскоклеточной карциномы кожи, по сравнению с контрольными для изотипа ADC.

На фиг. 31A-31J показано, что для конъюгатов активируемого антитела с лекарственным средством (AADC) по настоящему описанию, конъюгированных либо с PEG2-vc-MMAD, либо с vc-MMAE, показана более низкая цитотоксичность против множества линий клеток, происходящих из злокачественных опухолей, чем для соответствующим образом конъюгированного конъюгата исходного антитела против CD71 с лекарственным средством. Происходящие из злокачественных опухолей линии клеток, которые обрабатывали ADC или AADC, получены из плоскоклеточной карциномы кожи (A431, фиг. 31A и 31B), аденокарциномы легкого (A549, фиг. 31C и 31D), гипофарингеальной карциномы (FaDu, фиг. 31E и 31F), немелкоклеточного рака легкого (NCI-H292, фиг. 31G и 31H) и аденокарциномы поджелудочной железы (VxPC3, фиг. 31I и 31J).

Для ADC антител против CD71 человека показана сходная друг с другом цитотоксическая эффективность против линий клеток. Для AADC антител против CD71 человека показана более низкая эффективность, чем для ADC исходного антитела против CD71, что можно приписать эффекту маскировки маскирующей группы. В этом исследовании, различные ADC или AADC антител против CD71 человека (TF02.13-3001 или TF02.18-2001, конъюгированные с указанным лекарственным средством) по настоящему описанию и контрольные для изотипа конъюгаты с лекарственным средством применяли для клеток в указанных концентрациях. Цитотоксичность определяли как процент от популяции необработанных клеток, которую использовали в качестве контроля.

Пример 28. Цитотоксичность ADC антител против CD71 для различных линий клеток, происходящих из злокачественных опухолей

В этом примере показано, что для конъюгатов антител против CD71 человека с лекарственным средством (ADC) по настоящему описанию показана значительная цитотоксичность против множества линий клеток, происходящих из злокачественных опухолей.

В табл. 23 показаны наблюдаемые EC50 конъюгатов антител против CD71 с лекарственным средством (ADC) по настоящему описанию, конъюгированных с vc-MMAE. В этом исследовании антитело против CD71 человека Ab 21-12-vc-MMAE по настоящему описанию применяли в диапазоне концентраций для указанных клеток. Цитотоксичность определяли как процент от популяции необработанных клеток, которую использовали в качестве контроля, и EC50 рассчитывали на основании полученной кривой

цитотоксичности.

Таблица 23. EC50 для цитотоксичности антитела против CD71-vc-MMAE

Источник злокачественной опухоли	Линия клеток	EC50 (нМ)
Рак поджелудочной железы	Мiapaca2	0,2
	HPAF 2	0,2
	BxPC3	0,37
Колоректальный рак	SW480	0,11
	SW1417	0,17
	HT29	0,18
	Ls411N	0,2
	SW48	0,2
	Ls174T	0,23
	Lovo	0,27
	HCT-116	0,54
	DLDI	1,76
	Fadu	0,40
	A253	0,83
	Мелкоклеточная карцинома головы и шеи	SCC9
KYSE 70		0,6
SCC1		0,51
KYSE 150		0,47
SAS		0,33
BHY		0,25
SCC25		0,24
A431		0,22
NCI H292		0,3
Detroit 562		0,3
Рак легкого	A549	0,49
	NCI H2141	0,5
	NCI-H69	0,57
	NCI H526	0,7
	HS766T	1,02
	NCI H727	1,29
	NCI H889	1,3
Неходжжеская лимфома	Ramos	0,2
	Raji	0,3
Рак яичника	OVCA3	0,20
	ET201	0,49
Рак молочной железы	HCC1806	0,2
	MDA MB231	1,1

Пример 29. Экспрессия CD71 на линиях клеток мелкоклеточного рака легкого

В этом примере показано, что антитело и конъюгаты антитела с лекарственным средством против CD71 по настоящему описанию связывают CD71 на множестве линий клеток мелкоклеточного рака легкого (SCLC), в основном эквивалентно и специфически, как показано по отсутствию связывания контроля для изотипа или контрольного для изотипа ADC.

На фиг. 32A и 32B и в табл. 24 показан уровень связывания антител и ADC против CD71 по настоящему описанию с линиями клеток SCLC DMS 79 и DMS 153. В этом исследовании, связывание антител и ADC по настоящему описанию с указанными линиями клеток проводили с использованием стандартного способа мечения FACS. Кратко, клетки метили в указанных концентрациях с использованием указанных антител по настоящему описанию: антитела против CD71 человека (антитела против CD71 человека Ab21.12) или антитела против CD71 человека, конъюгированного с дуокармицином (антитела против CD71 человека Ab21.12-Duoc) или соответствующего контроля для изотипа (пализумумаба) и затем проводили детекцию с использованием меченного Alexa Fluor 647 вторичного антитела козы против IgG человека. В табл. 24 ниже показаны равновесные константы диссоциации на основании наблюдаемых кривых связывания. Эти результаты показывают, что антитело против CD71 человека 21.12 (CD71-Ab) и соответствующий ему ADC связываются с по существу эквивалентной аффинностью.

Таблица 24. Иллюстративная наблюдаемая активность связывания CD71 для активируемых антител против CD71

Тестируемое вещество	DMS 79, Kd (нМ)	DMS 153, Kd (нМ)
Ab 21.12	0,8983	4,471
Ab 21-12-Duoc	1,087	2,298

Пример 30. Антипролиферативный эффект антител против CD71

В этом примере показано, что для антител против CD71 человека по настоящему описанию, связывающих CD71 на линиях клеток злокачественных опухолей, показан антипролиферативный эффект по сравнению с контролем для изотипа.

На фиг. 33A и 33B показано ингибирование пролиферации клеток посредством применения антитела против CD71 Ab 21.12 по настоящему описанию для линий клеток H292 и HCC1806, по сравнению с контролем для изотипа. В этом исследовании, указанные клетки высевали при плотности 1000 клеток на лунку в 96-луночный планшет и оставляли для адгезии на ночь. Добавляли равный объем тестируемого вещества в двукратной по отношению к указанной концентрации и обеспечивали инкубацию планшетов

в течение 5 суток. Затем измеряли жизнеспособность с использованием реагента Cell Titer Glo (Promega), и ингибирование пролиферации определяли как процент от популяции необработанных клеток, которую использовали в качестве контроля. Результаты показывают, что для антител против CD71 по настоящему описанию показано значительное ингибирование пролиферации (EC50 ~4 нМ для клеток H292 и ~ 10 нМ для клеток HCC1806)

Пример 31. Экспрессия CD71 во множестве образцов метастазирующих злокачественных опухолей

В этом примере показано, что CD71 экспрессируется в большом количестве и разнообразии полученных от пациентов метастазирующих опухолей по иммуногистохимическому (ИНС) окрашиванию с использованием антитела против CD71.

На фиг. 34 показано, что CD71 экспрессируется на умеренном или высоком уровне в большом количестве и разнообразии полученных от пациентов образцов метастазирующих опухолей, с использованием ИНС окрашивания с использованием с использованием закупленного из коммерческих источников антитела против CD71 на микромассивах множества тканей опухолей, полученных от пациентов (ТМА). На фиг. 34 показано обобщение уровня ИНС окрашивания CD71 в ТМА, показывающее, что в большом количестве ядер, полученных из образцов метастазирования от множества пациентов, показан сильный сигнал CD71.

Пример 32: Визуализация *in vivo* активируемых антител против CD71 в модели на мышах ксенотрансплантата рака поджелудочной железы

В этом примере показано, что для активируемых антител против CD71 по настоящему описанию показана активация *in vivo*, зависящая от опухолеассоциированной протеазы, и связывание с CD71, экспрессированным в модели на мышах ксенотрансплантата рака поджелудочной железы, посредством флуоресцентной визуализации *in vivo*.

На фиг. 35 показана визуализация *in vivo* живых мышей с ксенотрансплантатами опухолей поджелудочной железы (клеток VxPC3) с использованием конъюгированных с флуоресцентной меткой антител против CD71 и активируемых антител против CD71 по настоящему описанию. В этом исследовании, самкам мышей *nu/nu* в возрасте 7-8 недель имплантировали подкожно в правый задний пах 5×10^6 клеток VxPC3, линии клеток, происходящей из злокачественной опухоли поджелудочной железы человека. После того, как опухоли вырастали до 300-380 мм³, антитело против CD71 Ab 21.12 по настоящему описанию ("антитело против CD71"), активируемое антитело против CD71 по настоящему описанию ("CD71 TF02.13-2012"), или замаскированное антитело против CD71 по настоящему описанию, лишенное домена CM ("CD71 TF02.13-NSUB"), вводили каждой из мышей в дозе 1 мг/кг. Вводимые антитела метили посредством конъюгации с флуоресцентной меткой AlexFluor 750. Мышей подвергали флуоресцентной визуализации *in vivo* через 96 ч после введения антител, с использованием сигнала возбуждения при 745 нм и детекции сигнала излучения при 800 нм. Шкала показывает относительную амплитуду детектированного флуоресцентного сигнала.

Результаты этого иллюстративного исследования показывают, что флуоресцентные сигналы от меченного немаскированного антитела против CD71 по настоящему описанию и меченного активируемого антитела против CD71 по настоящему описанию накапливались в ксенотрансплантате. В отличие от этого соответствующее замаскированное антитело против CD71, но с отсутствием участка расщепления протеазой (CM), не накапливалось на поддающемся детекции уровне в участке ксенотрансплантата опухоли. Без связи с какой-либо конкретной теорией, это иллюстративное исследование показало, что активируемые антитела против CD71 по настоящему описанию можно активировать *in vivo* посредством расщепления опухолеассоциированной протеазой, таким образом, позволяя активированному активируемому антителу против CD71 связывать CD71 в ксенотрансплантате опухоли до степени, сравнимой с немаскированным антителом против CD71 по настоящему описанию. Замаскированное антитело против CD71, лишенное домена расщепления протеазой (CM) по настоящему описанию, не было активировано таким же способом, и таким образом, не связывалось существенно с ксенотрансплантатом опухоли.

Пример 33. Визуализация *in vivo* активируемых антител против CD71 в модели на мышах метастазирования рака молочной железы

В этом примере показано, что для активируемых антител против CD71 по настоящему описанию показана активация *in vivo*, зависящая от опухолеассоциированной протеазы, и связывание с CD71, экспрессированным в модели на мышах метастазирования рака молочной железы, посредством визуализации *in vivo*.

На фиг. 36 показана визуализация *in vivo* живых мышей из модели на мышах метастазирования рака молочной железы, с использованием конъюгированных с флуоресцентной меткой антител против CD71 и активируемых антител против CD71 по настоящему описанию, и где клетки злокачественных опухолей излучали также биолюминесцентный сигнал. В этом исследовании самкам мышей *nu/nu* в возрасте 7-8 недель инъецировали в левый желудочек 5×10^5 клеток MDA-MB-231-luc2-D3LN, линии клеток, происходящей из злокачественной опухоли молочной железы человека, экспрессирующей биолюминесцентный фермент люциферазу. Мышам с поддающимися детекции клетками злокачественных опухолей (как определено по биолюминесцентному сигналу посредством визуализации *in vivo*) вводили внутри-

венную инъекцию 5 мг/кг контрольного для изотипа антитела паливизумаба ("изотип"), антитела против CD71 Ab21.12 по настоящему описанию ("антитело против CD71"), или активируемого антитела по настоящему описанию ("CD71 TF02.13-3001"). Вводимые антитела метили посредством конъюгации с флуоресцентной меткой AlexFluor 750. Мышей подвергали флуоресцентной визуализации *in vivo* через 48 часов после введения антител, с использованием сигнала возбуждения при 745 нм и детекции сигнала излучения при 800 нм. После флуоресцентной визуализации антител, мышам инъецировали внутривенно 3 мг люциферина, и затем подвергали биолюминесцентной визуализации *in vivo* через 10 мин после инъекции с заблокированным возбуждением и открытым излучением.

Результаты этого иллюстративного исследования показывают, что флуоресцентные сигналы от меченного немаскированного антитела против CD71 по настоящему описанию и меченного активируемого антитела против CD71 по настоящему описанию накапливались в той же локализации, что и локализация опухоли, как определено по перекрыванию биолюминесцентных и флуоресцентных сигналов. В отличие от этого, соответствующим образом меченное контрольное для изотипа антитело не накапливалось на поддающейся детекции уровне в участке опухоли или вблизи участка опухоли. Без связи с какой-либо конкретной теорией, это иллюстративное исследование показало, что активируемые антитела против CD71 по настоящему описанию можно активировать *in vivo* посредством расщепления опухолеассоциированной протеазой, таким образом, позволяя активированному активируемому антителу против CD71 связываться с CD71 в модели метастазирования опухоли до степени, сравнимой с немаскированным антителом против CD71 по настоящему описанию.

Пример 34. Визуализация *in situ* активируемых антител против CD71

В этом примере показано, что для активируемых антител против CD71 по настоящему описанию показана зависимость от опухолей активация *in situ* и связывание с CD71, экспрессированным в модели на мышцах ксенотрансплантата немелкоклеточного рака легкого (NSCLC) посредством иммуногистохимического (ИНС) окрашивания.

На фиг. 37 показан анализ ИНС окрашивания срезов тканей для ксенотрансплантатов опухолей H292 NSCLC с использованием антител против CD71 и активируемых антител против CD71 по настоящему описанию. В этом исследовании, срезы тканей из ксенотрансплантатов опухолей H292 предварительно инкубировали либо в присутствии (+BSPI), либо в отсутствие (-BSPI) коктейля ингибиторов протеаз широкого спектра (Protease Inhibitor Cocktail Set III, EDTA-Free (Cat. No. 539134, EMD Millipore) в разведении 1:15 и в 20 мМ EDTA в буфере Tris). Затем срезы тканей инкубировали в течение 2 ч при комнатной температуре с антителом против CD71 Ab 21.12 по настоящему описанию ("антитело против CD71") или активируемыми антителами против CD71 по настоящему описанию ("CD71 TF02.13-3001", "CD71 TF02.13-2001" или "CD71 TF02.13-2012"). После интенсивной промывки для удаления несвязанного материала, присутствие связанных антител против CD71 или активированных антител против CD71 по настоящему описанию детектировали с использованием вторичного антитела осла против IgG человека, меченного AlexaFluor 647 (Cat. No. 709-605-149, Jackson ImmunoResearch). Без связи с какой-либо конкретной теорией, это иллюстративное исследование показало, что для активируемых антител против CD71 по настоящему описанию показана активация *in situ* и связывание с CD71 в срезах тканей ксенотрансплантатов, которое ингибировали посредством предварительной инкубации тканей с широким спектром ингибиторов протеаз. Для немаскированного антитела против CD71 по настоящему описанию показано связывание с CD71 *in situ* в срезах тканей ксенотрансплантатов, независимо от присутствия или отсутствия предварительной инкубации с ингибиторами протеаз.

Другие варианты осуществления

В то время как изобретение описано в отношении его подробного описания, приведенное выше описание предназначено для иллюстрации, а не ограничения объема изобретения, определенного объемом прилагаемой формулы изобретения. Другие аспекты, преимущества и модификации включены в объем следующего.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент (АВ), которое специфически связывается с CD71 млекопитающего, где АВ специфически связывается с CD71 человека и CD71 яванского макака,

где АВ содержит определяющую комплементарность область 1 (CDR1) варибельной области тяжелой цепи (VH) с последовательностью GYTFTSYWMH (SEQ ID NO: 9); определяющую комплементарность область 2 (CDR2) VH с последовательностью AIYPGNSETG (SEQ ID NO: 10); определяющую комплементарность область 3 (CDR3) VH с последовательностью ENWDPGFAF (SEQ ID NO: 11); CDR1 варибельной области легкой цепи (VL) с последовательностью SASSSVYYMY (SEQ ID NO: 12) или CRASSSVYYMY (SEQ ID NO: 13); CDR2 VL с последовательностью STSNLAS (SEQ ID NO: 14) и CDR3 VL с последовательностью QQRNYPYT (SEQ ID NO: 15).

2. Активируемое антитело, которое в активированном состоянии связывается с CD71 млекопитающего, содержащее

антитело или его антигенсвязывающий фрагмент (AB), которое специфически связывается с CD71 млекопитающего, где AB специфически связывается с CD71 человека и CD71 яванского макака,

где AB содержит CDR1 VH с последовательностью GYTFTSYWMH (SEQ ID NO: 9); CDR2 VH с последовательностью AIYPGNSETG (SEQ ID NO: 10);

CDR3 VH с последовательностью ENWDPGFAF (SEQ ID NO: 11); CDR1 VL с последовательностью SASSSVYYMY (SEQ ID NO: 12) или CRASSSVYYMY (SEQ ID NO: 13); CDR2 VL с последовательностью STSNLAS (SEQ ID NO: 14) и CDR3 VL с последовательностью QRRNYPYT (SEQ ID NO: 15);

маскирующую группу (MM), которая ингибирует связывание AB с CD71 млекопитающего, если активированное антитело находится в нерасщепленном состоянии; и

расщепляемую группу (CM), присоединенную к AB, где CM представляет собой полипептид, действующий как субстрат для протеазы.

3. Активируемое антитело по п.2, где MM обладает константой диссоциации связывания с AB, которая выше константы диссоциации AB с CD71 млекопитающего.

4. Активируемое антитело по п.2 или 3, где MM не влияет или не конкурирует с AB за связывание с CD71 млекопитающего, если активированное антитело находится в расщепленном состоянии

5. Активируемое антитело по любому из пп.2-4, где MM представляет собой полипептид длиной не более 40 аминокислот.

6. Активируемое антитело по любому из пп.2-5, где полипептидная последовательность MM отличается от последовательности CD71 человека.

7. Активируемое антитело по любому из пп.2-6, где полипептидная последовательность MM не более чем на 50% идентична любому природному партнеру связывания AB.

8. Активируемое антитело по любому из пп.2-7, где CM является субстратом для протеазы, которая активна в пораженной заболеванием ткани.

9. Активируемое антитело по любому из пп.2-8, где AB присоединено к CM.

10. Активируемое антитело по любому из пп.2-9, где AB напрямую присоединено к CM.

11. Активируемое антитело по любому из пп.2-10, где AB присоединено к CM через связывающий пептид.

12. Активируемое антитело по любому из пп.2-11, где MM присоединена к CM таким образом, что активированное антитело в нерасщепленном состоянии содержит следующее структурное расположение от N-конца к C-концу: MM-CM-AB или AB-CM-MM.

13. Активируемое антитело по любому из пп.2-12, где активированное антитело содержит связывающий пептид между MM и CM.

14. Активируемое антитело по любому из пп.2-13, где активированное антитело содержит связывающий пептид между CM и AB.

15. Активируемое антитело по любому из пп.2-14, где активированное антитело содержит первый связывающий пептид (LP1) и второй связывающий пептид (LP2), и где активированное антитело в нерасщепленном состоянии имеет следующее структурное расположение от N-конца к C-концу: MM-LP1-CM-LP2-AB или AB-LP2-CM-LP1-MM; где два связывающих пептида не должны быть идентичны друг другу и/или где каждый LP1 и LP2 представляет собой пептид длиной приблизительно 1-20 аминокислот.

16. Активируемое антитело по п.2, содержащее тяжелую цепь с последовательностью SEQ ID NO: 325 или 699 и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 327, 329, 331, 333, 335, 337, 650, 652, 654, 656, 658, 660, 670-673, 701-712, 721-788, 809-836 и 841-908.

17. Активируемое антитело по любому из пп.2-16, где MM содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 16-295 и 297-314, и

CM содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 356-423, 680-698, 713, 714, и 789-808.

18. Активируемое антитело по п.17, где MM содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 16, 17 и 297-314, и CM содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 406-423, 680-698, 713, 714 и 807-808.

19. Конъюгированное активированное антитело, которое в активированном состоянии связывается с CD71 млекопитающего, содержащее

активируемое антитело по любому из пп.2-18 и средство, конъюгированное с AB, где средство представляет собой токсин или его фрагмент.

20. Конъюгированное активированное антитело, которое в активированном состоянии связывается с CD71 млекопитающего, содержащее

активируемое антитело по любому из пп.2-18 и средство, конъюгированное с AB, где средство представляет собой детектируемую группу.

21. Конъюгированное антитело или конъюгированное активированное антитело, содержащее антитело по п.1, конъюгированное со средством, или конъюгированное активированное антитело по п.19 или 20;

где (i) когда средство представляет собой токсин или его фрагмент, его выбирают из группы, со-

стоящей из ингибитора микротрубочек, повреждающего нуклеиновую кислоту средства, доластатина или его производного, ауристати́на или его производного, майтанзиноида или его производного, дуокармицина или его производного, калихеамицина или его производного и пирролобензодиазепина или его производного, ауристати́на E или его производного, монометилауристати́на E (ММАЕ), монометилауристати́на F (ММАF), монометилауристати́на D (ММАД), майтанзиноида, выбранного из группы, состоящей из DM1 и DM4, майтанзиноида DM4, майтанзиноида DM1, дуокармицина, пирролбензодиазепина или димера пирролбензодиазепина; или

(ii) когда средство представляет собой детектируемую группу, детектируемая группа представляет собой диагностическое средство.

22. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.1, или активируемое антитело по любому из пп.2-18, или конъюгированное антитело или конъюгированное активируемое антитело по любому из пп.19-21, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 3-5, и вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 6-8.

23. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.1, или активируемое антитело по любому из пп.2-18, или конъюгированное антитело или конъюгированное активируемое антитело по любому из пп.19-21, где его антигенсвязывающий фрагмент выбран из группы, состоящей из Fab-фрагмента, F(ab')₂-фрагмента, scFv, scAb.

24. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.1, или активируемое антитело по любому из пп.2-18, или конъюгированное антитело или конъюгированное активируемое антитело по любому из пп.19-21, где АВ специфически связывается с CD71 человека.

25. Активируемое антитело по любому из пп.2-18 или 22-24, или конъюгированное антитело, или конъюгированное активируемое антитело по любому из пп.19-24, где

(i) антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 3-5, и вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 6-8 и 809-908; и/или

(ii) активируемое антитело содержит:

(a) тяжелая цепь АВ содержит аминокислотные последовательности CDR VH, соответствующие SEQ ID NO: 9, 10 и 11,

(b) легкая цепь АВ содержит аминокислотные последовательности CDR VL, соответствующие SEQ ID NO: 12, 14 и 15,

(c) MM содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 16, 17, 309 и 314, и

(d) CM содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 359, 382, 789, 390, 370, 397, 377, 406, 423, 680-690, 713, 412, 691-698, 714 и 407; и/или

(iii) активируемое антитело содержит комбинацию аминокислотных последовательностей, где для данной комбинации аминокислотных последовательностей:

(a) тяжелая цепь АВ содержит аминокислотную последовательность VH, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 3, 4 и 5, или последовательности CDR VH, соответствующие SEQ ID NO: 9, 10 и 11,

(b) легкая цепь АВ содержит аминокислотную последовательность VL, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 3, 4 и 5, или последовательностей CDR VL либо SEQ ID NO: 12, 14 и 15, либо SEQ ID NO: 13, 14 и 15,

(c) MM содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 16, 17 и 297-314, и

(d) CM содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 356, 358, 359, 362, 370, 377-379, 382, 389, 390, 392, 395-407, 412, 680-698, 713, 714 и 789-808; и/или

(iv) активируемое антитело содержит

тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 325 или 699; и

легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 327, 329, 331, 333, 335, 337, 650, 652, 654, 656, 658, 660, 670-673, 701-712, 721-788, 809-836 и 841-908.

26. Конъюгированное антитело, содержащее:

(a) антитело или его антигенсвязывающий фрагмент (AB), которое специфически связывается с CD71 млекопитающего, где AB содержит:

(i) последовательность CDR1 VH GYTFTSYWMH (SEQ ID NO: 9); последовательность CDR2 VH AIYPGNSETG (SEQ ID NO: 10); последовательность CDR3 VH ENWDPGFAG (SEQ ID NO: 11); последовательность CDR1 VL SASSSVYYMY (SEQ ID NO: 12) или CRASSSVYYMY (SEQ ID NO: 13); последовательность CDR2 VL STSNLAS (SEQ ID NO: 14) и последовательность CDR3 VL QQRNYPYT (SEQ

ID NO: 15) или

(ii) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 3-5, и вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 6-8;

(b) средство, конъюгированное с АВ, где средство выбрано из группы, состоящей из ауристатина Е, монометилауристатина F (ММАF), монометилауристатина Е (ММАЕ), монометилауристатина D (ММАД), майтанзиноида DM4, майтанзиноида DM1, пирролобензодиазефина, димера пирролобензодиазефина и дуокармицина.

27. Конъюгированное активируемое антитело, которое в активированном состоянии связывается с CD71 млекопитающего, содержащее

антитело или его антигенсвязывающий фрагмент (АВ), которое специфически связывается с CD71 млекопитающего, где АВ специфически связывается с CD71 человека и CD71 яванского макака;

маскирующую группу (ММ), которая ингибирует связывание АВ с CD71 млекопитающего, если активируемое антитело находится в нерасщепленном состоянии;

расщепляемую группу (СМ), присоединенную к АВ, где СМ представляет собой полипептид, который действует как субстрат для протеазы; и

средство, конъюгированное с АВ, где АВ содержит:

(i) последовательность CDR1 VH GYTFTSYWMH (SEQ ID NO: 9); последовательность CDR2 VH AIYPGNSETG (SEQ ID NO: 10); последовательность CDR3 VH ENWDPGFAP (SEQ ID NO: 11); последовательность CDR1 VL SASSSVYYMY (SEQ ID NO: 12) или CRASSSVYYMY (SEQ ID NO: 13); последовательность CDR2 VL STSNLAS (SEQ ID NO: 14) и последовательность CDR3 VL QQRNYPYT (SEQ ID NO: 15) или

(ii) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 3-5, и вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 6-8, или

(iii) тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 325 или 699, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 327, 329, 331, 333, 335, 337, 650, 652, 654, 656, 658, 660, 670-673, 701-712, 721-788, 809-836 и 841-908; и

где средство выбрано из группы, состоящей из ауристатина Е, монометилауристатина F (ММАF), монометилауристатина Е (ММАЕ), монометилауристатина D (ММАД), майтанзиноида DM4, майтанзиноида DM1, пирролобензодиазефина, димера пирролобензодиазефина и дуокармицина.

28. Активируемое антитело по любому из пп.2-18, 22-25 или конъюгированное антитело, или конъюгированное активируемое антитело по любому из пп.19-25 или 27,

где ММ содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 16-295 и 297-314, или выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 16, 17 и 297-314, или выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 356-423, 680-698, 713, 714 и 789-808, или выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 406-423, 680-698, 713, 714 и 807, 808.

29. Конъюгированное антитело или конъюгированное активируемое антитело по любому из пп.19-28, где средство конъюгировано с АВ посредством линкера, и

где линкер, с помощью которого средство конъюгировано с АВ, содержит группу SPDB, группу vc или группу PEG2-vc; и/или

где линкер и токсин, конъюгированный с АВ, содержит группу SPDB-DM4, группу vc-ММАД, группу vc-ММАЕ, группу vc-дуокармицин или группу PEG2-vc-ММАД.

30. Конъюгированное антитело или конъюгированное активируемое антитело по п.29, где линкер представляет собой расщепляемый линкер.

31. Конъюгированное антитело или конъюгированное активируемое антитело по п.29, где линкер представляет собой нерасщепляемый линкер.

32. Конъюгированное активируемое антитело или конъюгированное антитело, содержащее антитело или его антигенсвязывающий фрагмент (АВ), которое в активированном состоянии связывается с CD71 млекопитающего; и

токсин, конъюгированный с АВ посредством линкера,

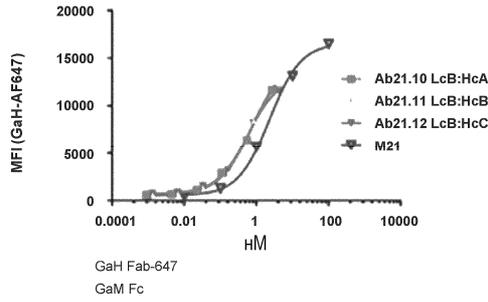
где конъюгированное активируемое антитело или конъюгированное антитело содержит аминокислотные последовательности, линкер и токсин, выбранные из:

(a) АВ содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность тяжелой цепи или последовательность вариабельного домена тяжелой цепи, выбранную из SEQ ID NO: 5 или SEQ ID NO: 325,

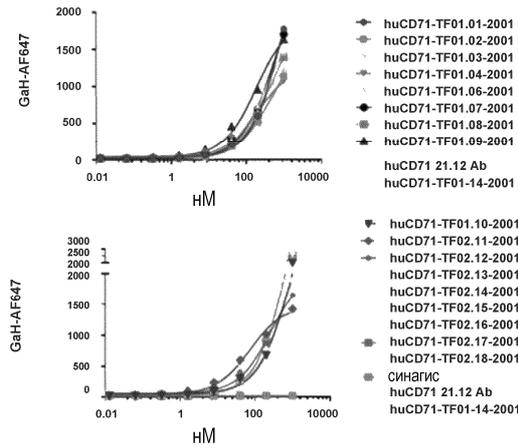
(b) АВ содержит легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность легкой цепи или последовательность вариабельного домена легкой цепи, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 7, 323, 327, 810, 329, 812, 331, 814, 333, 816, 335, 818, 337, 820, 673, 824, 702, 826, 671, 822, 704, 828, 706, 830, 708, 832, 710, 834, 712, 836, 650, 809, 652, 811, 654, 813, 656, 815, 658, 817, 660, 819, 672, 823, 701, 825, 670, 821, 703, 827, 705, 829, 707, 831, 709, 833, 711 и 835, и

- (с) линкер, выбранный из группы, состоящей из vc, PEG2-vc, и SPDB, и
- (d) токсин, выбранный из группы, состоящей из MMAD, MMAE, дуокармицина и DM4.
33. Фармацевтическая композиция, содержащая антитело по любому из пп.1 или 22, активируемое антитело по любому из пп.2-18, 22-25 или 28, или конъюгированное антитело, или конъюгированное активируемое антитело по любому из пп.19-32 и носитель.
34. Фармацевтическая композиция по п.33, содержащая дополнительное средство, где дополнительное средство представляет собой лекарственное средство.
35. Выделенная молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая выделенное антитело по любому из пп.1 или 22.
36. Выделенная молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая активируемое антитело по любому из пп.2-18, 22-25 или 28.
37. Вектор, содержащий выделенную молекулу нуклеиновой кислоты по п.35 или 36.
38. Способ получения антитела или активируемого антитела посредством культивирования клетки в условиях, обеспечивающих экспрессию антитела или активируемого антитела, где клетка содержит молекулу нуклеиновой кислоты по п.36 или вектор по п.37.
39. Способ изготовления активируемого антитела, которое в активированном состоянии связывается с CD71 млекопитающего, где способ включает:
- (а) культивирование клетки, содержащей конструкцию нуклеиновой кислоты, кодирующую активируемое антитело, в условиях, обеспечивающих экспрессию активируемого антитела, где активируемое антитело содержит активируемое антитело по любому из пп.2-18, 22-25 или 28; и
- (b) выделение активируемого антитела.
40. Способ по п.39, дополнительно содержащий конъюгирование средства с выделенным активируемым антителом, где средство представляет собой токсин или его фрагмент, или детектируемую группу; и/или где:
- (i) когда средство представляет собой токсин или его фрагмент, его выбирают из группы, состоящей из ингибитора микротрубочек, повреждающего нуклеиновую кислоту средства, доластатина или его производного, ауристати́на или его производного, майтанзиноида или его производного, дуокармицина или его производного, калихеамицина или его производного и пирролобензодиазепина или его производного, ауристати́на E или его производного, метилметилауристати́на E (MMAE), метилметилауристати́на F (MMAF), метилметилауристати́на D (MMAD), майтанзиноида, выбранного из группы, состоящей из DM1 и DM4, майтанзиноида DM4, майтанзиноида DM1, дуокармицина, пирролобензодиазепина или димера пирролобензодиазепина; или
- (ii) когда средство представляет собой детектируемую группу, детектируемая группа представляет собой диагностическое средство.
41. Способ лечения, облегчения симптома или задержки прогрессирования нарушения или заболевания, ассоциированного с клетками, экспрессирующими CD71 млекопитающего, включающий введение больному терапевтически эффективного количества антитела по любому из пп.1 или 22, активируемого антитела по любому из пп.2-18, 22-25 и 28, конъюгированного антитела или конъюгированного активируемого антитела по любому из пп.19-32, или фармацевтической композиции по п.33 или 34.
42. Способ по п.41, где нарушение или заболевание представляют собой нарушение или заболевание, при которых пораженные клетки экспрессируют CD71 млекопитающего.
43. Способ по п.41 или 42, где нарушение или заболевание представляет собой злокачественную опухоль; где злокачественная опухоль представляет собой аденокарциному, рак желчных протоков, рак мочевого пузыря, рак кости, рак молочной железы, карциноидную злокачественную опухоль, рак шейки матки, холангиокарциному, колоректальный рак, рак ободочной кишки, рак эндометрия, глиому, рак головы и шеи, лейкоз, рак печени, рак легкого, лимфому, меланому, рак ротоглотки, рак яичника, рак поджелудочной железы, рак предстательной железы, метастазирующую устойчивую к кастрации карциному предстательной железы, рак почки, саркому, рак кожи, плоскоклеточный рак, рак желудка, рак яичка, рак щитовидной железы, злокачественную опухоль мочеполовой системы или уротелиальный рак.
44. Способ по п.43, где рак молочной железы представляет собой трижды отрицательный рак молочной железы или отрицательный по Her2 рак молочной железы.
45. Способ по п.43, где рак головы и шеи представляет собой плоскоклеточный рак головы и шеи.
46. Способ по п.43, где рак легкого представляет собой немелкоклеточный рак легкого.
47. Способ по п.43, где рак легкого представляет собой мелкоклеточный рак легкого.
48. Способ по любому из пп.41-47, где способ предназначен для ингибирования или уменьшения роста, пролиферации или метастазирования клеток, экспрессирующих CD71 млекопитающего.
49. Способ по любому из пп.41-47, где способ предназначен для ингибирования, блокирования или предотвращения связывания природного лиганда с CD71 млекопитающего, где природный лиганд представляет собой трансферрин.
50. Способ по любому из пп.41-47, где экспрессия и/или активность CD71 млекопитающего нарушена.
51. Способ по любому из пп.41-47, где способ включает введение дополнительного средства, где

дополнительное средство представляет собой лекарственное средство.



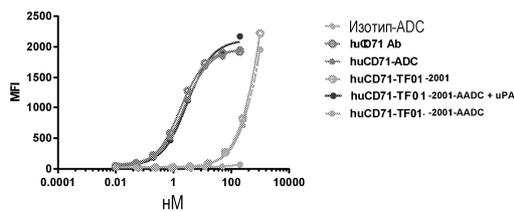
Фиг. 1



Активируемое антитело	$K_{срр}$	кратность маскировки
huCD71 TF01.01-2001	994.7	432
huCD71 TF01.02-2001	420.5	183
huCD71 TF01.03-2001	320.9	140
huCD71 TF01.04-2001	198.7	86
huCD71 TF01.06-2001	245.4	107
huCD71 TF01.07-2001	545.3	237
huCD71 TF01.08-2001	458.8	199
huCD71 TF02.09-2001	183.3	80
huCD71 TF02.10-2001	974.3	424
huCD71 TF02.11-2001	74.5	32
huCD71 TF02.12-2001	265.6	115
huCD71 TF02.13-2001	127.4	55
huCD71 TF02.14-2001	227.2	99
huCD71 TF02.15-2001	654.8	285
huCD71 TF02.16-2001	79.93	35
huCD71 TF02.17-2001	885.5	385
huCD71 TF02.18-2001	32.04	14
huCD71 TF01-2001	809.5	352
huCD71 21.12 Ab	2.288	1

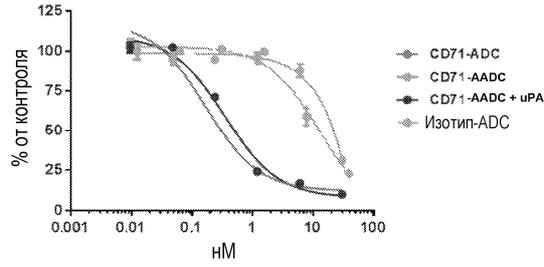
Фиг. 2

Связывание с клетками H292 в FACS

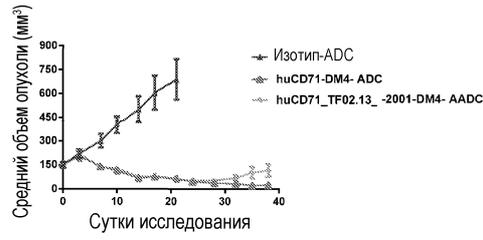


Фиг. 3А

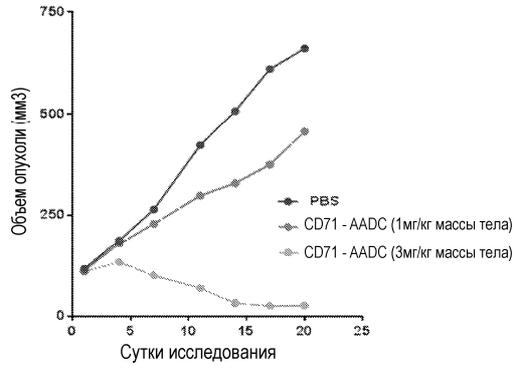
042024



Фиг. 3В

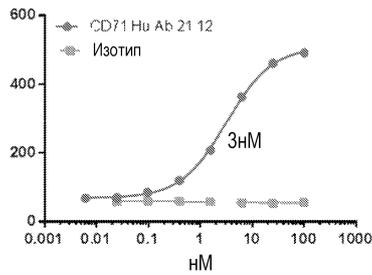


Фиг. 4

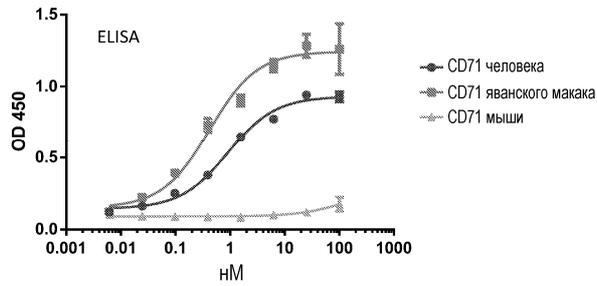


Фиг. 5

Клетки первичной почки яванского макака

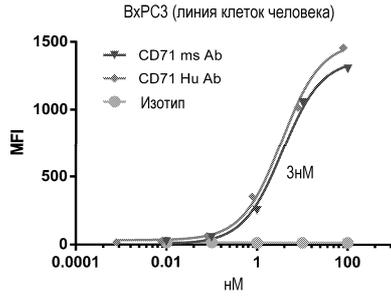


Фиг. 6А

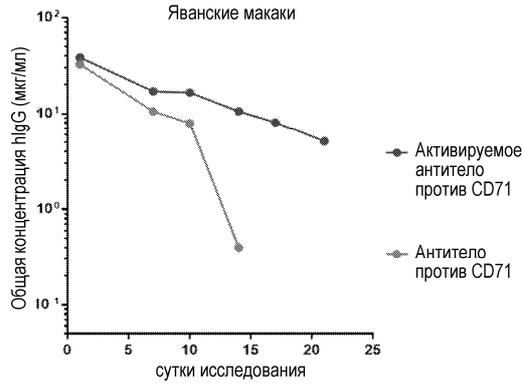


Фиг. 6В

042024

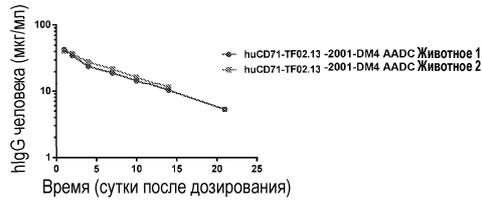


Фиг. 6С

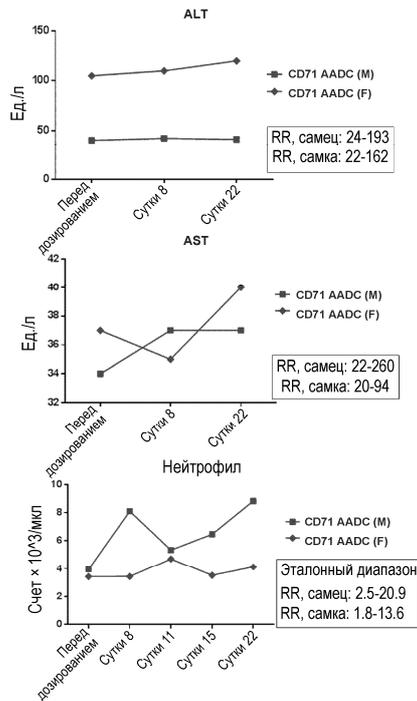


Фиг. 7

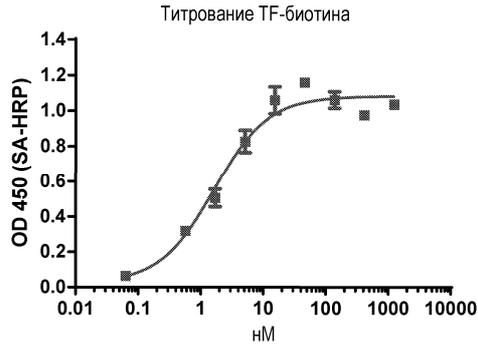
РК про-антитела против CD71 у яванских макаков



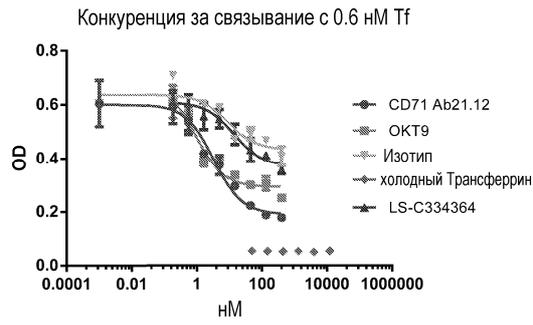
Фиг. 8



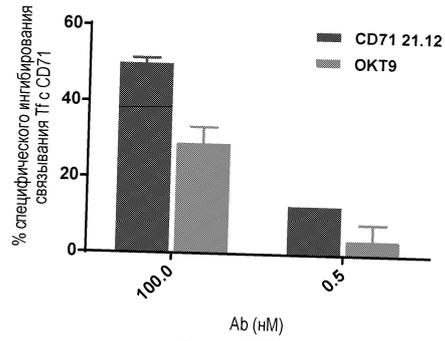
Фиг. 9



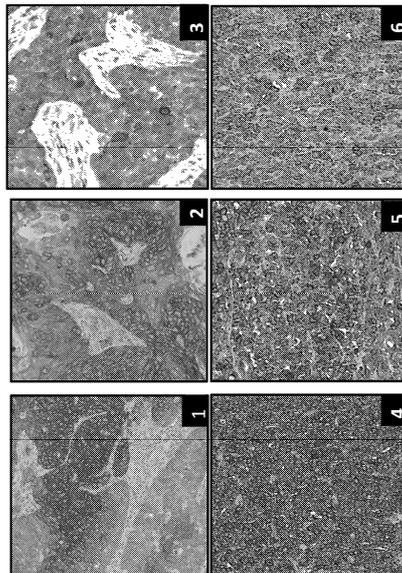
Фиг. 10



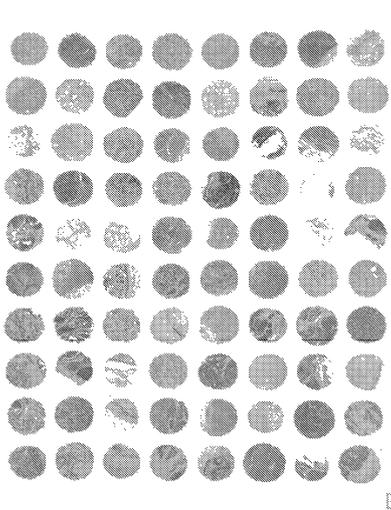
Фиг. 11А



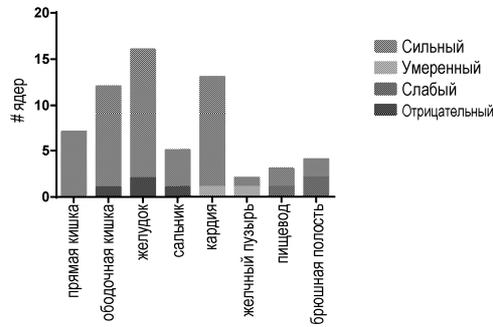
Фиг. 11В



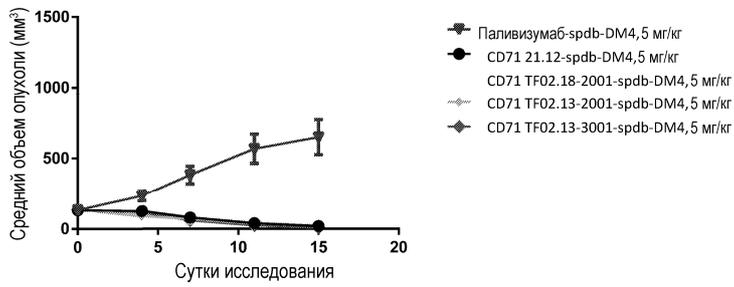
Фиг. 12А



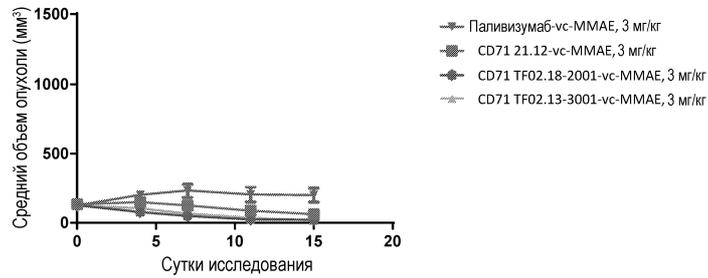
Фиг. 12В



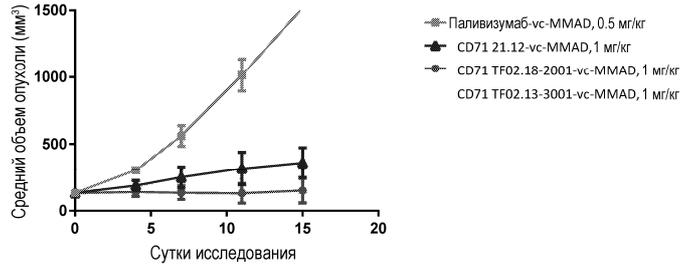
Фиг. 12С



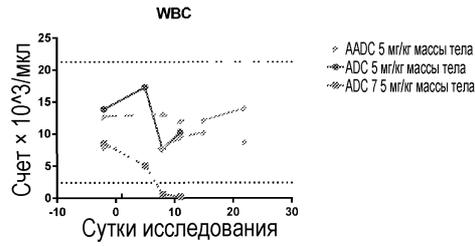
Фиг. 13А



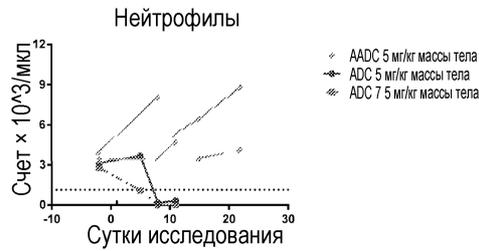
Фиг. 13В



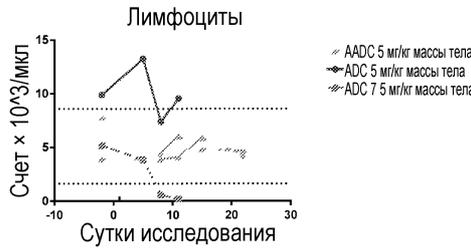
Фиг. 13С



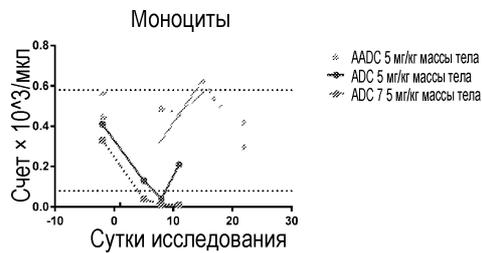
Фиг. 14А



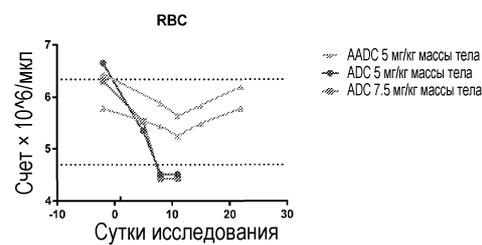
Фиг. 14В



Фиг. 14С

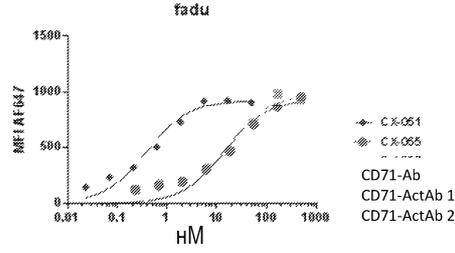


Фиг. 14D



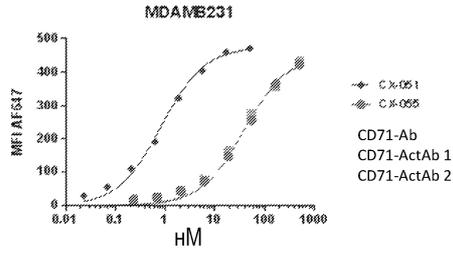
Фиг. 14Е

Клетки FadU



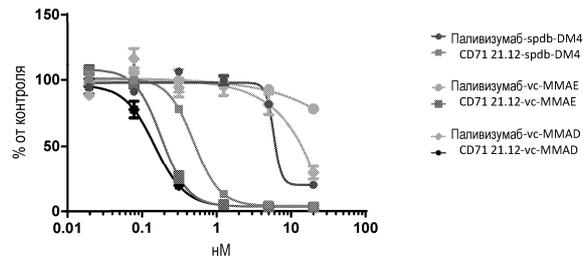
Фиг. 16С

Клетки MDA MB231



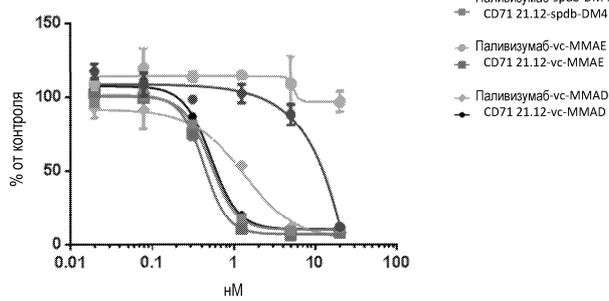
Фиг. 16D

Клетки HT29



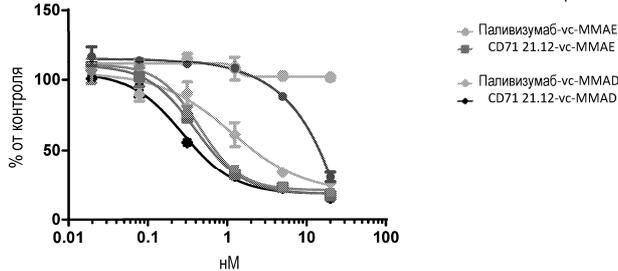
Фиг. 17А

ВхРСЗ

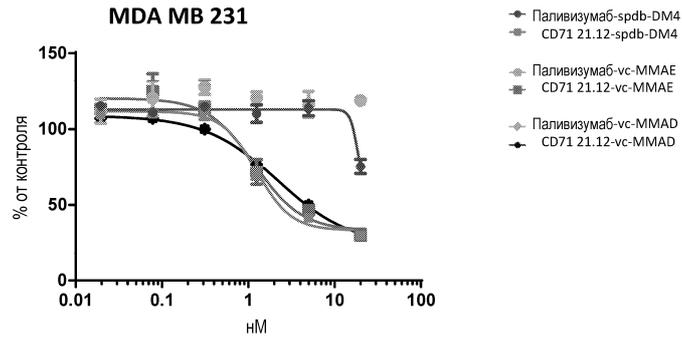


Фиг. 17В

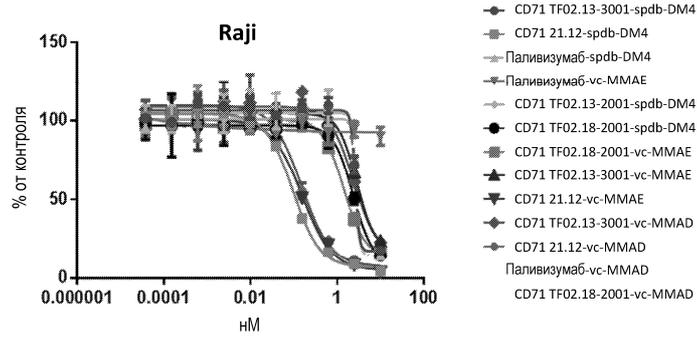
FaDu



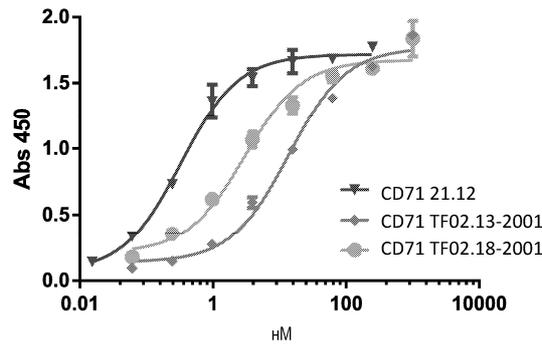
Фиг. 17С



Фиг. 17D

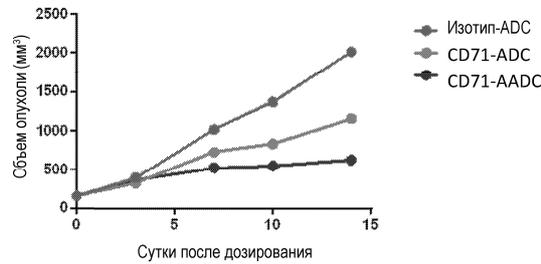


Фиг. 18



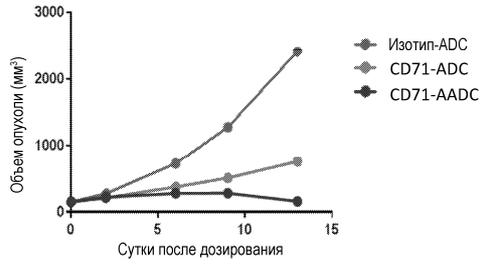
Фиг. 19

Модель LY2214

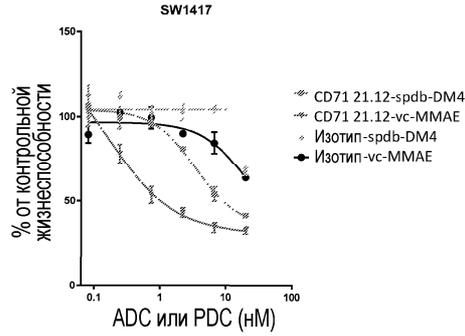


Фиг. 20A

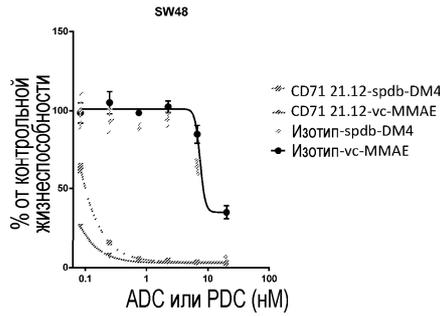
Модель LY0257



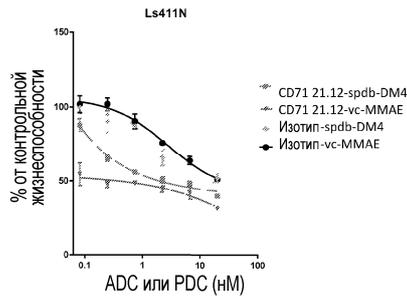
Фиг. 20B



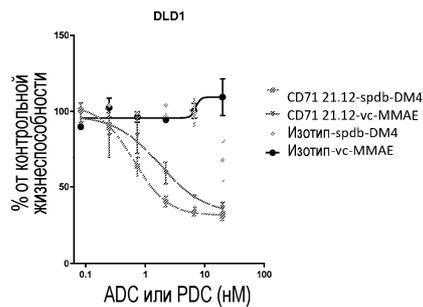
Фиг. 21A



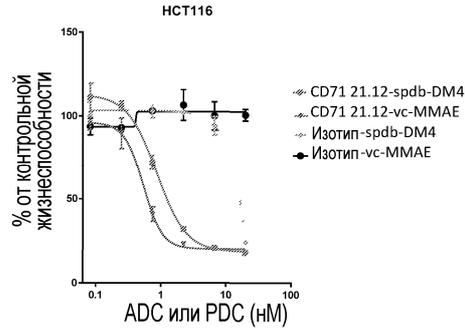
Фиг. 21B



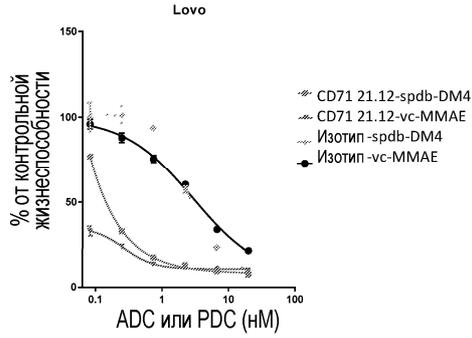
Фиг. 21C



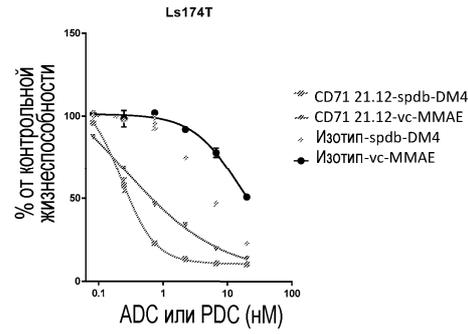
Фиг. 21D



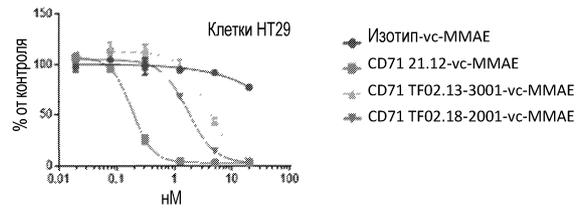
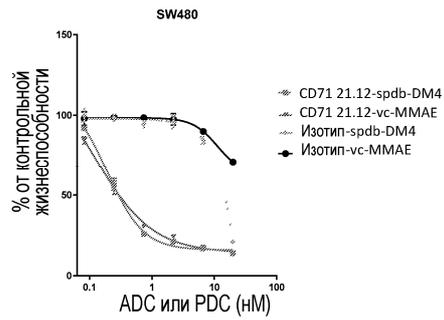
Фиг. 21Е



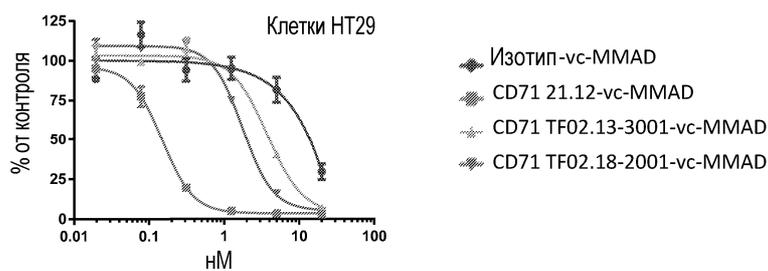
Фиг. 21F



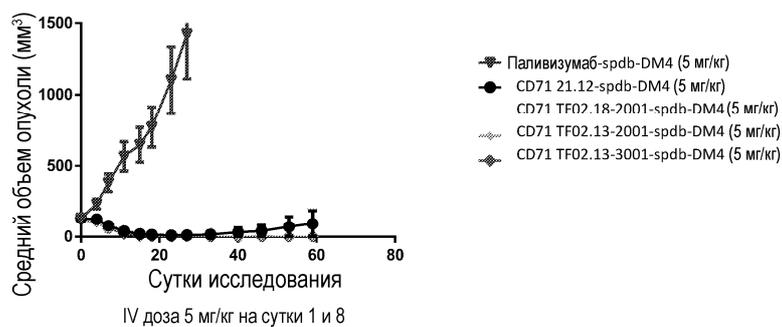
Фиг. 21G



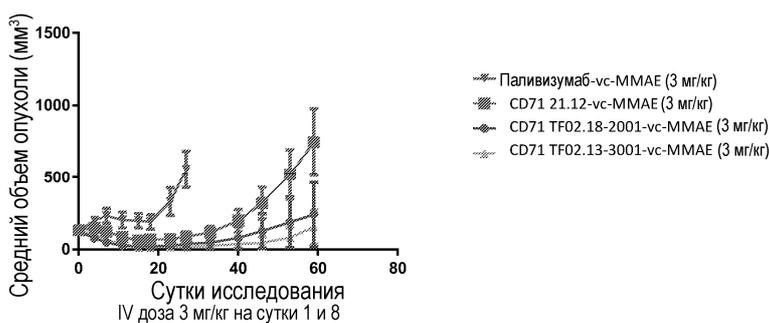
Фиг. 22А



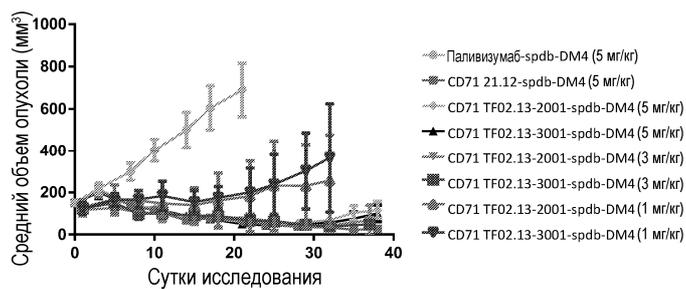
Фиг. 22В



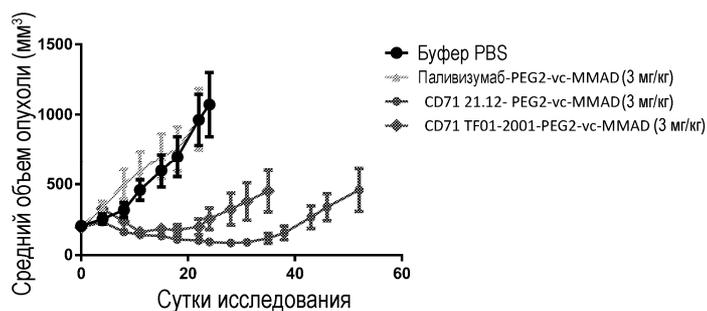
Фиг. 23А



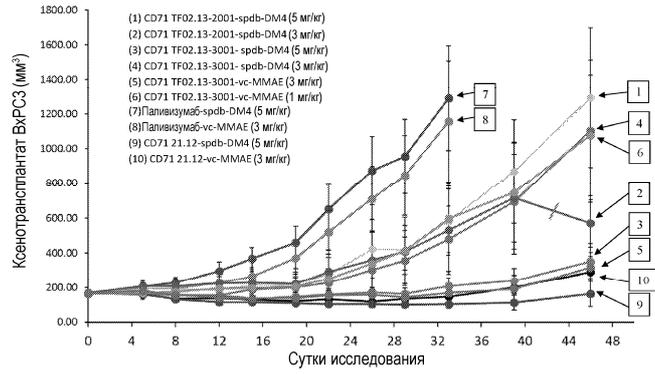
Фиг. 23В



Фиг. 24А

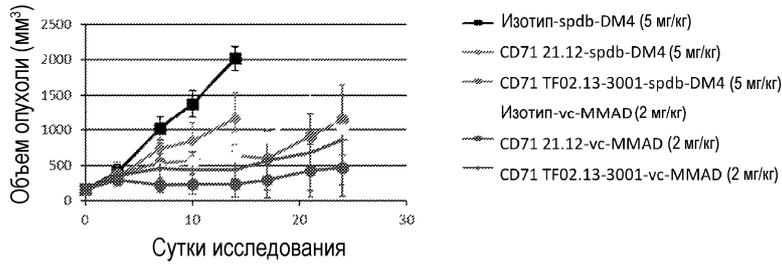


Фиг. 24В



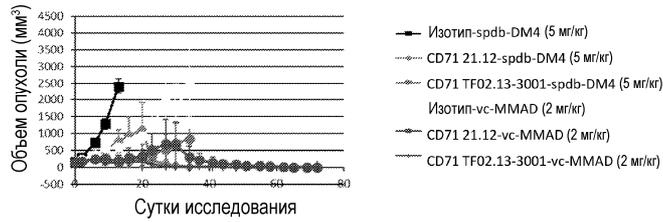
Фиг. 25

LY2214



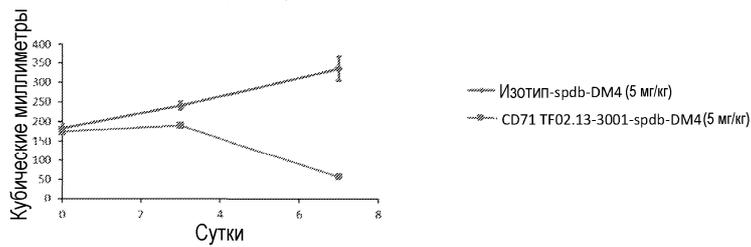
Фиг. 26А

LY0257



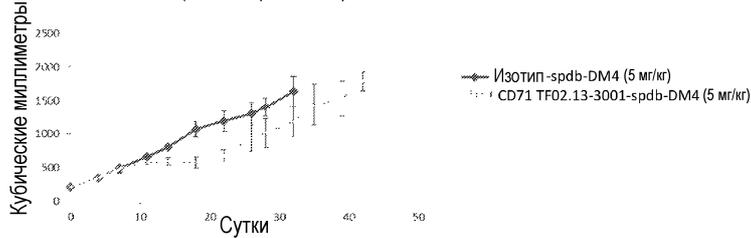
Фиг. 26В

СТГ-0166 (легкое)

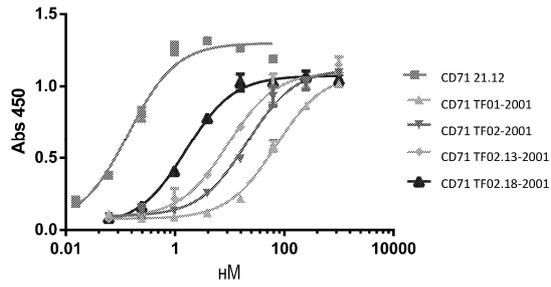


Фиг. 27А

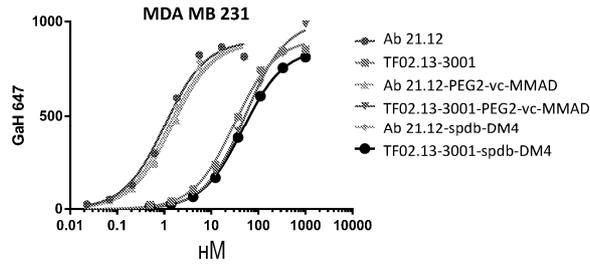
СТГ-0774 (эндометриальная)



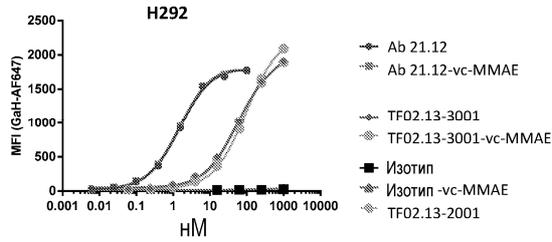
Фиг. 27В



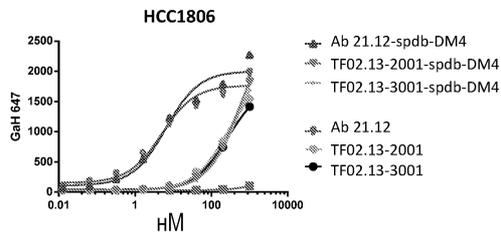
Фиг. 28



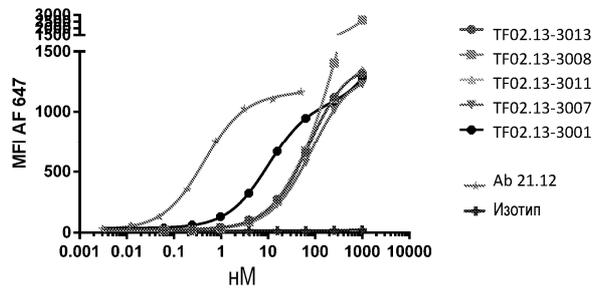
Фиг. 29А



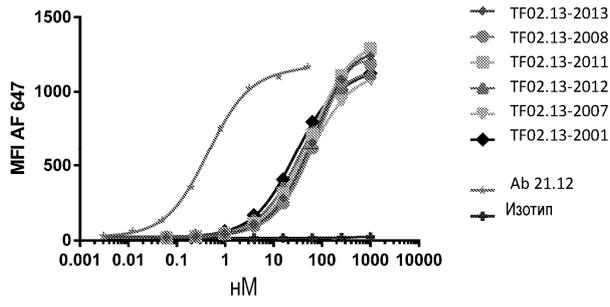
Фиг. 29В



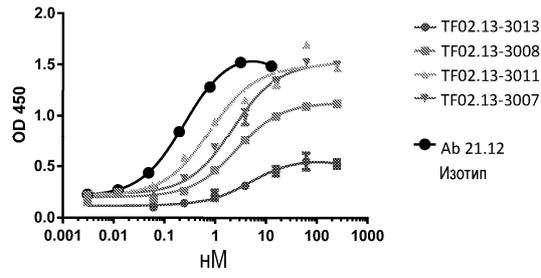
Фиг. 29С



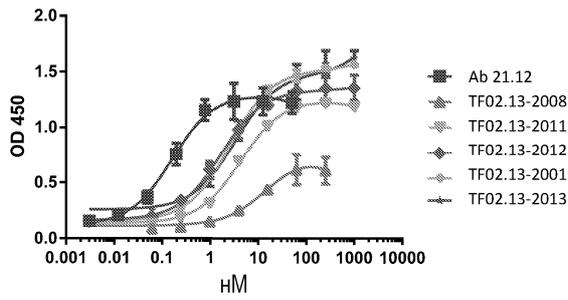
Фиг. 30А



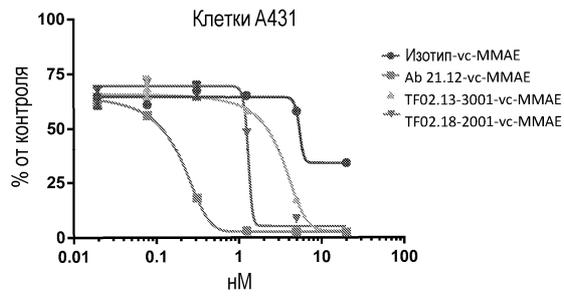
Фиг. 30В



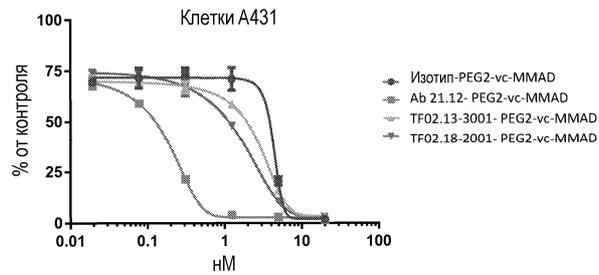
Фиг. 30С



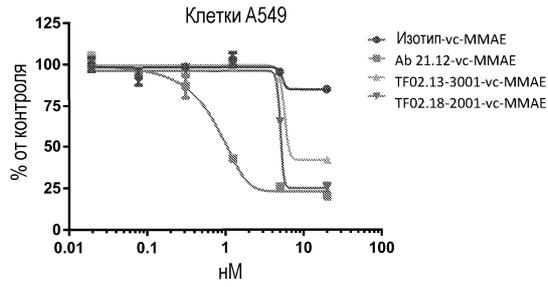
Фиг. 30D



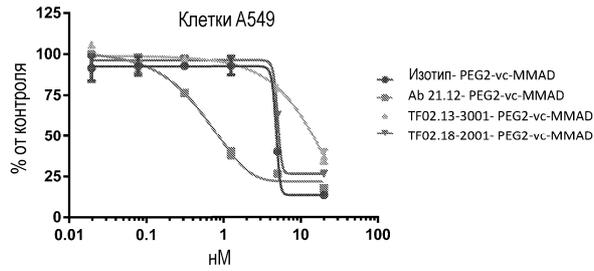
Фиг. 31А



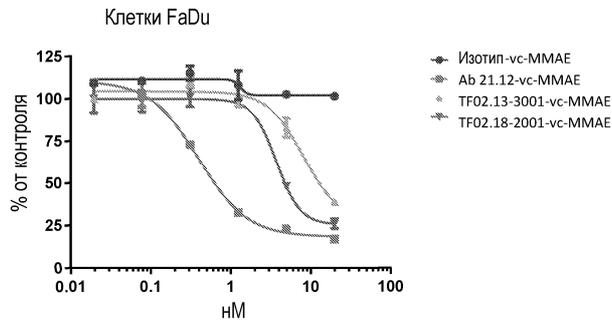
Фиг. 31В



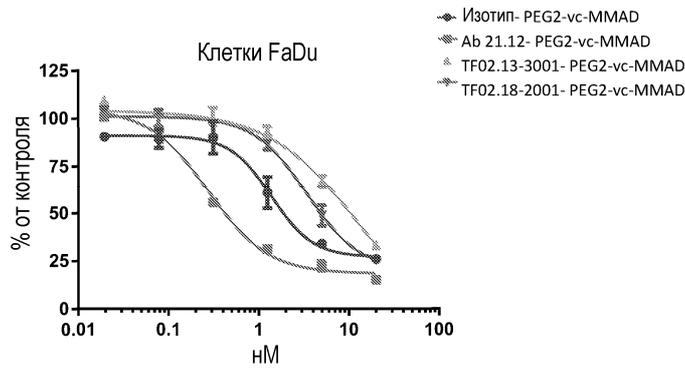
Фиг. 31С



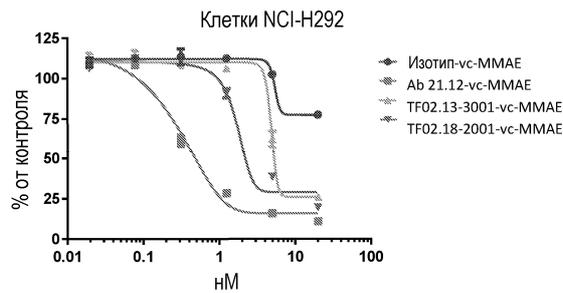
Фиг. 31D



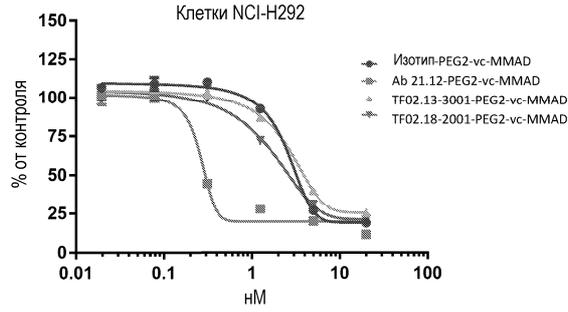
Фиг. 31E



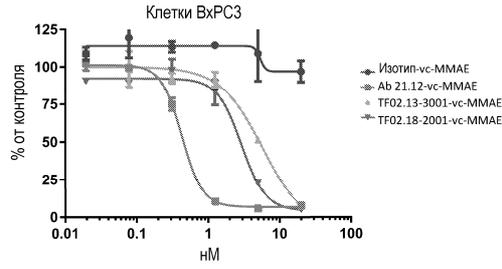
Фиг. 31F



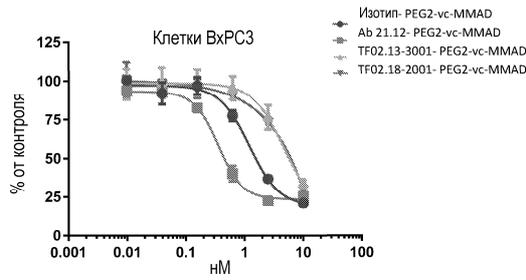
Фиг. 31G



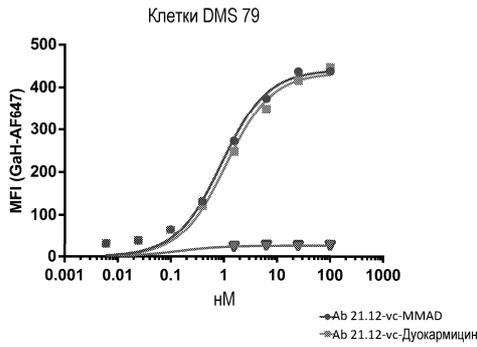
Фиг. 31Н



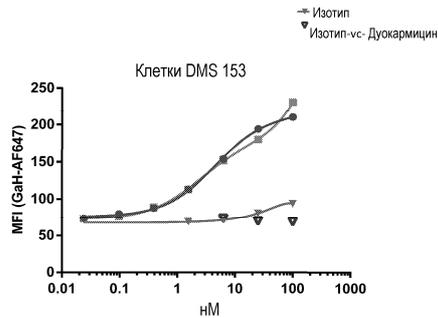
Фиг. 31П



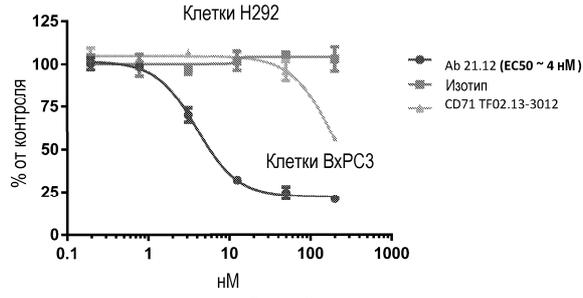
Фиг. 31И



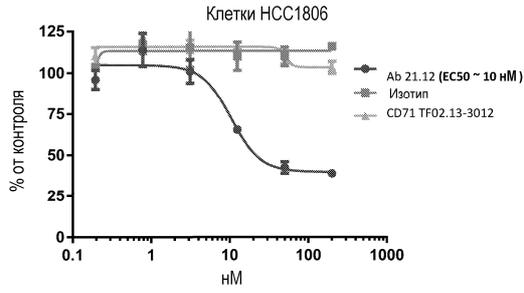
Фиг. 32А



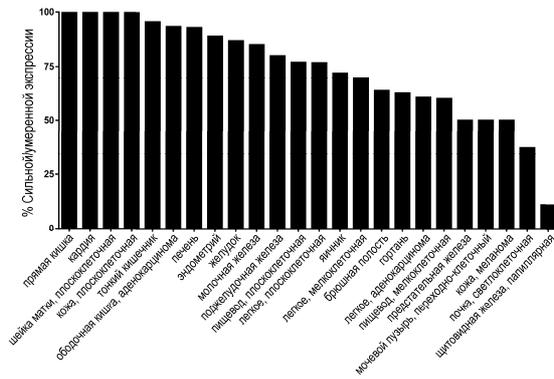
Фиг. 32В



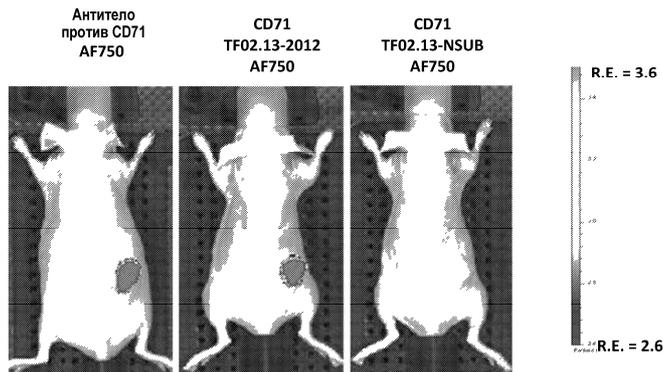
Фиг. 33А



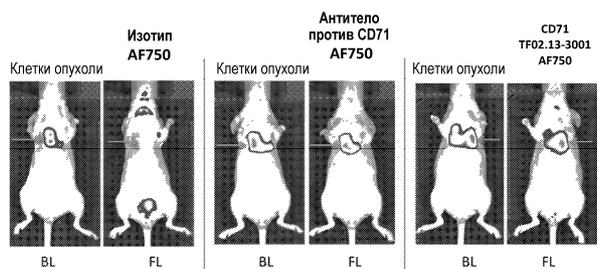
Фиг. 33В



Фиг. 34

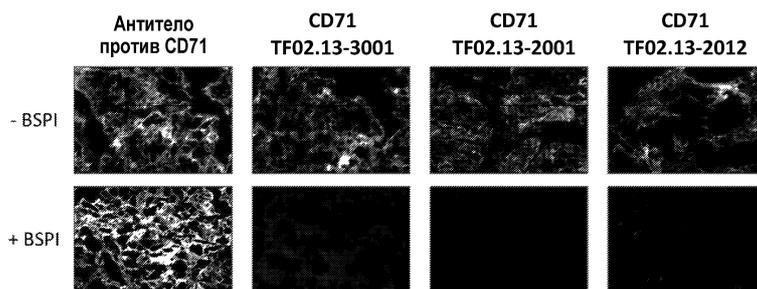


Фиг. 35



BL: билюминесцентная визуализация
 FL: флуоресцентная визуализация

Фиг. 36



Фиг. 37

